SYNTHESE, SOLUBILISIERUNG UND OXYGENIERUNG VON EISENPORPHYRINEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Martin Wolfgang Keck

aus Reutlingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0022

SYNTHESE, SOLUBILISIERUNG UND OXYGENIERUNG VON EISENPORPHYRINEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Martin Wolfgang Keck

aus Reutlingen

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 1986

Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Juni 1981 bis September 1985 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an dieser Arbeit.

"It has taken evolution about 10^9 years of trial and error to find a proper combination of a suitable polypeptide and an appropriate metal to generate an efficient oxygen carrier. In a period of a few times 10^1 years, chemists have unraveled the detailed molecular structure of this entity. The stage has thus been reached , therefore, where we can formulate a complementary goal. It should now be possible to synthesize novel entities in the laboratory, in principle, from coal, rocks, air, and water, that have molecular structures and properties analogous to those of the functional centers in biological oxygen carriers. Several laboratories have initiated substantial exploratory efforts in this direction. It will be of interest to see how many decades are required to synthesize an entity with features superior to those of hemerythrin, hemocyanin, or hemoglobin."

J.M. Klotz u. D.M. Kurtz, Acc. Chem. Res. 17, 16 (1984)

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B.	ALLGEMEINER TEIL	3
1.	Sauerstoffträger in der Biosphäre	3
1.1.	Irreversible Reaktionen mit molekularem Sauerstoff	3
1.1.1.	Cytochrom-Oxidase	4
1.1.2.	Cytochrom c	5
1.1.3.	Cytochrom P 450	6
1.2.	Reversible Reaktionen mit molekularem Sauerstoff	7
1.2.1.	Myoglobin	7
1.2.2.	Hämoglobin	10
1.2.3.	Hämerythrine	14
1.2.4.	Hämocyanine	16
2.	Synthetische Sauerstoffträger	17
2.1.	Monomolekulare Modellverbindungen	18
2.2.	Polymerverknüpfte Modellverbindungen	22
3.	Oxidationsmechanismen	25
3.1.	Dimerer Autoxidationsmechanismus	27
3.2.	Protonenkatalysierter Oxidationsmechanismus	28
3.3.	"Outer-Sphere"-Oxidationsmechanismus	29
4.	Dextran-Hämopolymere	30
4.1.	Synthese der Dextran-Hämopolymere	31
4.1.1.	Dextran als polymerer Träger	31
4.1.1.1.	Eigenschaften und Verwendung als Blutplasmaexpander	31
4.1.1.2.	Funktionalisierung von Dextran	35
4.1.1.3.	Kupplung mit N-terminal geschützten Aminosäuren	37

4.1.2.	Der proximale Ligand	42
4.1.3.	Kupplung der Dextran-Hämopolymere	49
4.2.	Oxygenierungsuntersuchungen an Dextran-Hämopolymeren	53
4.2.1.	Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe und Dextran-NH-Gly-His-Häm-Gly-His-OMe	54
4.2.2.	Dextran-NH-Gly-Häm-Gly-His-OMe	62
5.	Proteingebundene Porphyrinderivate	66
5.1.	Synthese und Charakterisierung der prosthetischen Gruppe Häm(mono)-Gly-His-OMe	68
5.2.	Albumingebundenes Häm(mono)-Gly-His-OMe; Kupplungsmethode und Oxygenierung	76
5.3.	Gelatinegebundenes Häm(mono)-Gly-His-OMe	84
5.4.	Synthese des Aktivzentrums Häm(mono)-methylimidazolpentylamid	86
6.	Liposomenverkapseltes Hämderivat	91
C.	EXPERIMENTELLER TEIL	99
1.	Allgemeines	99
2.	Geräte	99
3.	Chemikalien	100
4.	Dextran-Hämopolymere	102
4.1.	Funktionalisierung von Dextran	102
4.1.1.	Dextran-Carbonat	102
4.1.2.	Aminodextran	103
4.1.3.	2,4-Dinitrophenyl-Derivatisierung	104
4.1.4.	NBOC-Aminosäurederivate	104
4.1.5.	Kupplung der N-geschützten Aminosäuren an das funktionalisierte Dextran	107
4.1.6.	Photolytische Abspaltung der NBOC-Schutzgruppe	109

4.2.	Benzyloxycarbonyl-Glycin-Histidin-Methylester	111
4.2.1.	Ausgangsprodukte	111
4.2.2.	Benzyloxycarbonylglycin-N-hydroxy-succinimidester (Z-Gly-OSU)	111
4.2.3.	Benzyloxycarbonyl-Glycin-Histidin-Methyl-ester (Z-Gly-His-OMe)	112
4.3.	Kupplung der Dextran-Hämopolymere	114
4.4.	Oxygenierungsuntersuchungen	115
5.	Proteingebundene Porphyrinderivate	116
5.1.	Darstellung von Hämin(mono)-Gly-His-OMe	116
5.2.	Albumin- und Gelatinegebundenes Hämin(mono)-Gly-His-OMe	116
5.3.	Hämin(mono)-methylimidazolpentylamid	117
5.3.1.	1-Phthalimido-5-brom-pentan	117
5.3.2.	1-Phthalimido-5-N-(2-methylimidazol)-pentan	118
5.3.3.	1-Amino-5-N-(2-methylimidazol)-pentan	119
5.3.4.	Hämin(mono)-methylimidazolpentylamid	120
6.	Liposomenverkapseltes Häminderivat	126
D.	ZUSAMMENFASSUNG	127
E.	LITERATURVERZEICHNIS	129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
ATP	Adenosintriphosphat
API	3-(1-Imidazol)-propylamin
ASA	Aminosäureanalyse
Asp	Asparaginsäure
Boc	tert. Butyloxycarbonyl-
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
Ddz	α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl-
DNP	2,4-Dinitrophenyl-
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPG	2,3-Diphosphoglycerat
ESR	Elektronenspinresonanz
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Leu	Leucin
MHz	Megahertz
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
NBOC	o-Nitrobenzyloxycarbonyl-
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Phe	Phenylalanin
POE	Polyoxyethylen
TEA	Triethylamin
TDM	4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VIS	sichtbarer Absorptionsbereich
Z	Benzyloxycarbonyl

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Bei vielen Modellverbindungen für Metallproteine, die in der Lage sind mit molekularem Sauerstoff Komplexverbindungen zu bilden, ersetzen synthetische Polymere die Proteinkomponenten.

Um den physiologischen und toxikologischen Anforderungen an eine Modellverbindung für Hämoglobin und Myoglobin näherzukommen, sollen polymerverknüpfte Hämderivate synthetisiert werden, die sich ausschließlich aus natürlich vorkommenden Komponenten zusammensetzen. Gegenüber bereits bekannten Modellsubstanzen sollen natürliche Polymere wie das Polysaccharid Dextran, das Plasmaprotein Albumin oder Gelatine die Aufgaben des polymeren Trägers übernehmen. Bisher verwendete Imidazolliganden, die die Funktion des proximalen Histidins imitieren, sollen durch geeignete Histidinpeptide ersetzt werden, die kovalent an die Porphyrin-Peripherie gebunden sind.

Die Verbindung zwischen Dextran und Porphyrin soll durch eine kurze Peptidbrücke hergestellt werden. Bei deren Synthese reduzieren die Eigenschaften der zu verknüpfenden Substanzen die präparativen Möglichkeiten erheblich, sodaß geeignete Kupplungsmethoden erprobt werden müssen.

Eine Solubilisierungsmethode für die entsprechenden Aktivzentren durch Polypeptide soll entwickelt werden. Die erhaltenen Systeme können mit den Dextran-Hämopolymeren verglichen und Auswirkungen der veränderten Umgebung der Porphyrin-Aktivzentren auf die Stabilität von Sauerstoffkomplexen untersucht werden.

Die Einbettung in Liposomen ist eine weitere Möglichkeit zur Solubilisierung von Metallporphyrinen. Die Bildung von Lipidvesikeln kann jedoch durch Metallkomplexionen behindert werden. Es muß ein Verfahren gewählt werden, das die Einbettung von Eisen-III-Protoporphyrinderivaten ermöglicht. Die Stabilität der gebildeten Liposomen muß so groß sein, daß Oxygenierungsuntersuchungen, d.h. Reduktionen, Sauerstoff- und Kohlenmonoxid-Komplexbildungen möglich sind.

B. ALLGEMEINER TEIL

1. Sauerstoffträger in der Biosphäre

1.1. Irreversible Reaktionen mit molekularem Sauerstoff

Eine Reihe von Metallproteinen bilden Sauerstoffkomplexe, die als reaktive Zwischenstufen bei biochemischen Prozessen auftreten, also Partner bei irreversiblen Reaktionen des Sauerstoffs sind. Die Metallproteine werden als Bestandteile von Kreisprozessen aus den Reaktionsprodukten zurückgebildet, sodaß die Klassifizierung als enzymatisch katalysierte Reaktionen des Sauerstoffs gerechtfertigt ist. In einigen Proteinen findet man als prosthetische Gruppe Häm, den Eisen(II)-Komplex des Protoporphyrins IX oder dem Häm verwandte Komplexe. Hämoproteine sind wichtige Redoxkatalysatoren in der Atmungskette und bei der enzymatischen Hydroxylierung.

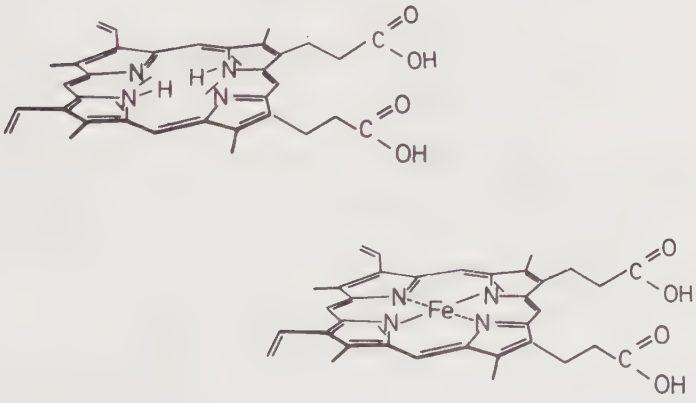


Abb. 1: Protoporphyrin IX und Häm

1.1.1. Cytochrom-Oxidase

Der Enzymkomplex Cytochrom-Oxidase ist an den Elektronentransportreaktionen in den Mitochondrien beteiligt. Er reagiert mit molekularem Sauerstoff und katalysiert die 4-Elektronen-Reduktion zu Wasser. Die dabei freiwerdende Energie kann durch Überführung von ADP in ATP gespeichert werden.

Das Enzym ist integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran. Es weist eine Molmasse von etwa 140 000[1-3] auf, besteht aus 12 Untereinheiten und enthält zwei Eisen- und zwei Kupferionen. Die genaue Lage der vier Metallionen im Enzym ist noch nicht bekannt. Gesichert sind jedoch zwei funktionelle Bestandteile, Cytochrom a und a_3 mit jeweils einer prosthetischen Gruppe, die ein Häm a und ein Kupferion enthält.

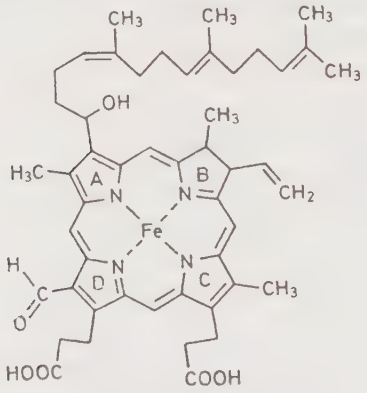


Abb. 2: Häm a

Während Cytochrom a_3 in der Lage ist, an seinem Häm a-Zentrum Sauerstoff zu binden, kann Cytochrom a an der dem Intermembranraum zugewandten Seite der inneren Mitochondrienmembran Cytochrom c anlagern. Mit diesen Kenntnissen kann ein schematisches Arbeitsmodell für die Reduktion von Sauerstoff an Cytochrom a_3 entworfen werden.

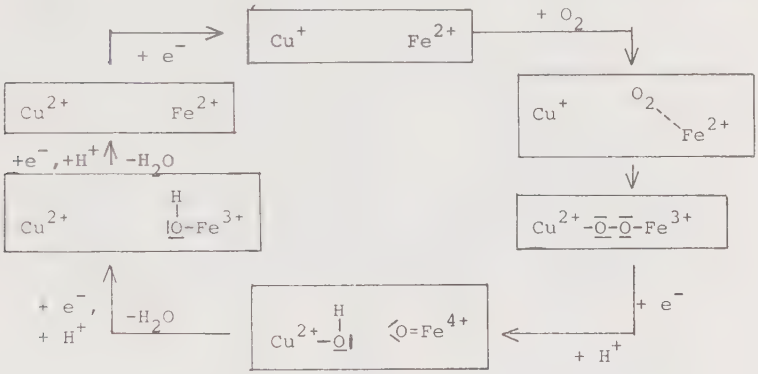


Abb. 3: Arbeitsmodell für Cytochrom-Oxidase[4)]

Durch die Übertragung von zwei Elektronen in einem Reaktionsschritt, je eines vom Kupfer- und vom Eisenion, kann die Bildung des aggressiven Hyperoxid-Radikals vermieden werden.

1.1.2. Cytochrom c

Cytochrom c ist ein wasserlösliches Hämoprotein, das die prosthetische Gruppe Häm c enthält. Das Molekül transportiert Elektronen, die über den Komplex mit Cytochrom a

in den Reaktionszyklus der Sauerstoffreduktion eingeschleust werden. Das Eisenzentralion im Häm c ist sechsfach koordiniert. Da alle Koordinationsstellen besetzt sind, ist Cytochrom c nicht zur Sauerstoffanlagerung fähig und zeigt auch keine Reaktion mit Kohlenmonoxid oder dem Cyanidanion. Die Einbindung in die hydrophobe Proteintasche führt zu einer Erhöhung des Reduktionspotentials verglichen mit dem freien Häm.

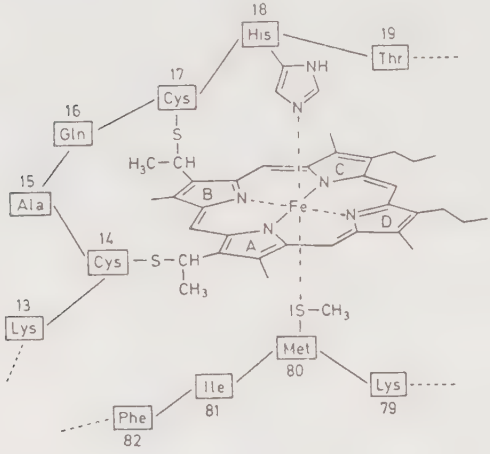


Abb. 4: Prosthetische Gruppe des Cytochrom c[4)]

1.1.3. Cytochrom P 450

Monooxygenasen der Gattung Cytochrom P 450 katalysieren die Hydroxylierung einer Vielzahl von Substraten. Spezifische Hydroxylasen wie die Steroid-Hydroxylasen sind an der Biosynthese körpereigener Substanzen beteiligt. Unspezifische Hydroxylasen dagegen hydroxylieren selbst relativ inerte, lipophile Stoffe, wie aliphatische und

aromatische Kohlenwasserstoffe. Sie spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung vieler Fremdstoffe und bei der Metabolisierung von Arzneimitteln. Die genaue Struktur des Cytochrom P 450 ist noch nicht aufgeklärt. Die Molmasse beträgt 45 000, die prosthetische Gruppe ist Häm. Die fünfte, axiale Koordinationsstelle am Eisen wird von einem Cystein-Schwefel-Atom besetzt. Aus ESR-spektroskopischen Untersuchungen kann auf Histidin als sechster Ligand geschlossen werden.
Die Reduktion des Sauerstoffs kann schematisch in zwei Einelektronenschritte zerlegt werden. Die Reduktion des Hämin-Eisen(III) zu Häm-Eisen(II) erfordert das erste Elektron, das zweite wird nach erfolgter Anlagerung auf ein Sauerstoffmolekül übertragen. Der entstandene Sauerstoffkomplex ist so stark aktiviert, daß ein Sauerstoffatom in die relativ inerte C-H Bindung eines Substrates eingeschoben werden kann. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert.

1.2. Reversible Reaktionen mit molekularem Sauerstoff

Metallproteine, die zur reversiblen Bindung von Sauerstoff in der Lage sind, bilden die zweite Gruppe der Sauerstoff-Metallproteine: die "Oxygen Carrier".

1.2.1. Myoglobin

Das Myoglobin ist das Sauerstoffspeicherprotein der Skelettmuskulatur. Es liegt als monomeres Häm-Protein vor mit einer Globinkette aus 153 Aminosäuren. Die Tertiär-Struktur weist 8 α-helikale Bereiche A-H auf und bildet eine apolare Tasche in der Umgebung der Hämgruppe.

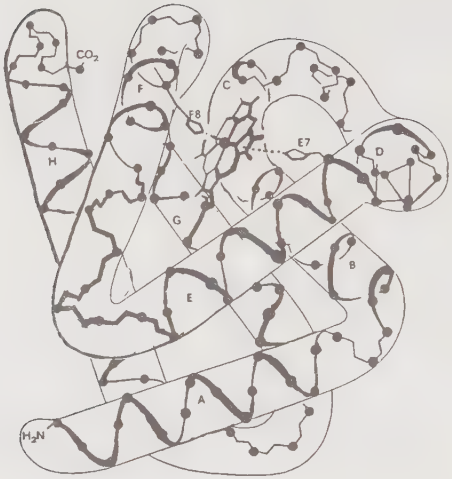


Abb. 5: Myoglobin[5)]

In der Deoxy-Form ist das Eisen-II-Zentralatom des Myoglobins pentakoordiniert. Die Porphyrin-Stickstoffatome nehmen vier Koordinationsstellen ein, der fünfte, axiale Ligand ist das proximale Histidin F 8. Durch die koordinative Bindung zwischen dem Stickstoffatom N_ε des Imidazolringes und dem Eisen-II-Zentralatom wird die Häm-Gruppe an der Globin-Peptidkette fixiert. Das Eisen-Atom bleibt außerhalb der Porphyrinringebene und ist etwa 0.5 Å[6,7)] in Richtung des proximalen Histidins lokalisiert. Die Ebene des Imidazolringes ist gegenüber dem Porpyhrin-Stiffstoffatomen eclipsed orientiert. Auf diese Weise wird die Struktur mit minimaler sterischer Hinderung erreicht.

Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen HN_δ des Histidins F 8 und CO von Leucin F 4[8] stabilisiert den Imidazolring in seiner Orientierung.

In Oxymyoglobin ist das Eisen-II-Zentralatom oktaedrisch koordiniert. Die sechste Koordinationsstelle nimmt ein Sauerstoffmolekül ein, das gewinkelt "end-on" gebunden ist. Der Ligand Sauerstoff wird vom distalen Histidin E 7 durch eine Wasserstoffbrückenbindung über das HN_ε-Atom des Imidazolringes gehalten[9] und vom Phenylalanin CD 1 abgeschirmt.

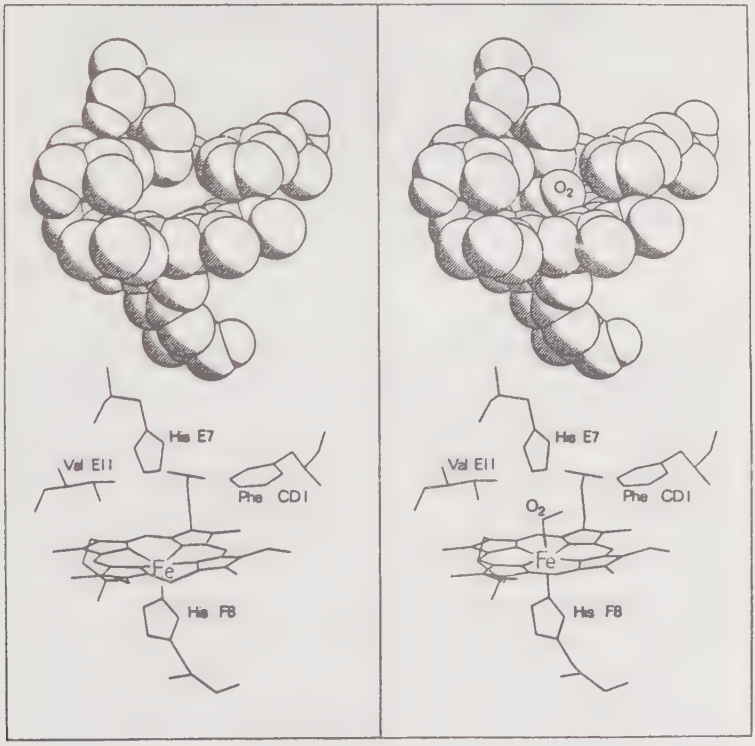


Abb. 6: Aktivzentrum des Deoxy- und Oxymyoglobins[11]

Im Sauerstoffkomplex des Myoglobins ist das Eisenatom in Richtung zur Porphyrinringebene zurückgerückt und liegt nur noch 0.2 Å[10,11] außerhalb. Der Abstand zum proximalen Histidin bleibt unverändert. Der Komplex wird stabilisiert durch die apolare Tasche, mit der das Globin die Häm-Gruppe umgibt. Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten bilden einen Cluster, der den Porphyrinring fixiert und den Sauerstoffkomplex gegen polare Wechselwirkungen abschirmt. Die beiden Propionsäurereste des Häms bilden Wasserstoffbrücken mit Histidin FG 3 und Arginin CD 3[8] aus.

Das Metmyoglobin mit einem Eisen-III-Zentralatom bildet keinen Sauerstoffkomplex. Die Position des sechsten Liganden nimmt ein Wassermolekül ein. Das Eisenatom bleibt 0.4 Å[12] außerhalb der Porphyrinringebene. Dieser größere Abstand im Vergleich zu Oxymyoglobin ist erklärbar mit der geringeren relativen Bindungsstärke zwischen dem Eisen-Zentralatom und dem koordinierten Wassermolekül.

1.2.2. Hämoglobin

Hämoglobin ist das rote Pigment des Blutes der Wirbeltiere. Es ist lokalisiert in den Erythrocyten und verantwortlich für den Sauerstofftransport von der Lunge zur Muskelfaser. In den Blutkapillaren der Muskeln wird der Sauerstoff an das Myoglobin des umgebenden Gewebes übergeben. Hämoglobin und Myoglobin enthalten dieselbe prosthetische Gruppe Häm. Sie unterscheiden sich in der Zusammensetzung und Struktur ihrer jeweiligen Peptidkomponente Globin. Im Gegensatz zum Myoglobin baut Hämoglobin eine Quartärstruktur aus 4 Untereinheiten auf; das Makromolekül erreicht die Molmasse von 64 450. Beim erwachsenen Menschen besteht ein Hämoglobin-Molekül aus 2 α- und 2 β-Untereinheiten. Diese unterscheiden sich durch die Länge der Globinketten: α-Globin hat 141, β-Globin 146 Aminosäuren.

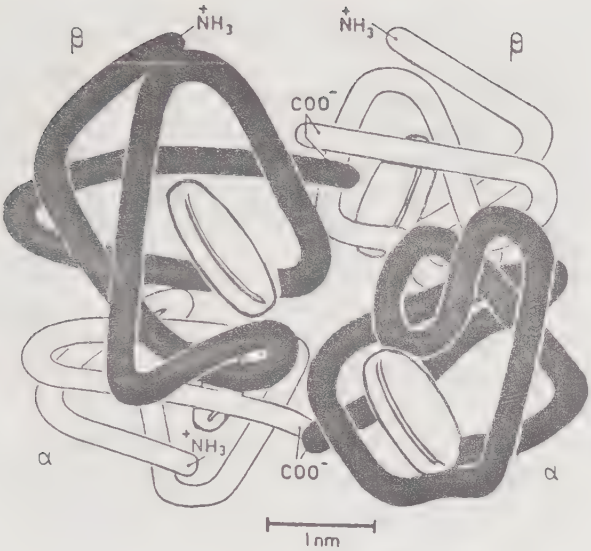


Abb. 7: Hämoglobin A[60)]

Der Mensch besitzt jedoch die genetischen Informationen für weitere 4 Hämoglobin-Monomeren, die im Laufe der pränatalen Entwicklung eine Rolle spielen. So weist beispielsweise das Hämoglobin F des menschlichen Fötus mit der Zusammensetzung $\alpha_2\gamma_2$ eine höhere Sauerstoffaffinität auf, als das Hämoglobin A des Blutes der Mutter und kann aus diesem den Sauerstoff übernehmen.

In der Tertiärstruktur der jeweiligen Untereinheiten unterscheiden sich die Hämoglobinketten nur geringfügig vom Myoglobin. Histidin F 8 und Histidin E 7 spielen die gleiche Rolle als direkter und indirekter Ligand beim Hämoglobin.

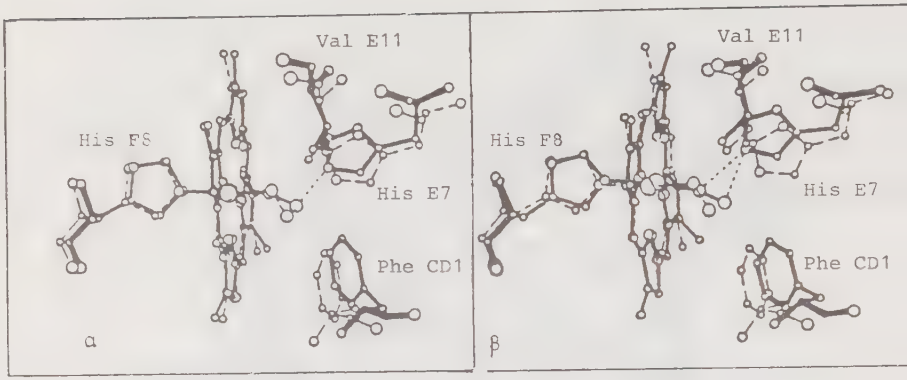


Abb. 8: Aktivzentrum der Oxyhämoglobin α- und β-Kette zum Vergleich überlagert dem gestrichelt gezeichneten Aktivzentrum des Oxymyoglobins[13)]

Wie beim Myoglobin befindet sich im Deoxyhämoglobin das Eisen-II-Zentralatom außerhalb der Porphyrinringebene, 0.6 Å in der α-Einheit und 0.63 Å in der β-Einheit[14)]. Der Porphyrinring ist dabei nicht völlig eben, sondern leicht in Richtung proximales Histidin gewölbt, d.h. das Eisenatom bildet die Spitze einer flachen tetragonalen Pyramide. Sterische Hinderung zwischen dem Wasserstoffatom an C_ε des Imidazolrings im proximalen Histidin F 8 und dem Häm sowie Wechselwirkungen des Häms mit Seitengruppen anderer Aminosäuren der F-Helix führen zu dieser Konfiguration, dem 'tense'- bzw. T-Zustand. Stark gespannt wird diese Struktur aber erst durch Aufnahme des sechsten Liganden Sauerstoff. Mit der Theorie des 'allosterischen Effektes'[1,15)] kann die Reaktion des Hämoglobin-Moleküls auf diese Spannung und die Kooperativität der vier Untereinheiten erklärt werden. Nimmt eine Hämoglobin-Untereinheit im deoxy-Zustand d.h. in der T-Konfiguration mit geringer

Sauerstoff-Affinität ein Sauerstoff-Molekül auf, kann der sterische Druck reduziert werden durch den Übergang des Hämoglobin-Moleküls in die 'relaxed'- oder R-Konfiguration. Dadurch wird die Bereitschaft der drei restlichen Untereinheiten, jeweils ebenfalls ein Molekül Sauerstoff aufzunehmen, erheblich vergrößert. Mit dem allosterischen Modell ist der sigmoide Verlauf der Sauerstoff-Bindungskurve für Hämoglobin erklärbar.

Im Oxyhämoglobin liegen alle vier Untereinheiten im R-Zustand vor. Die Eisen-II-Zentralatome befinden sich nahezu in der Ebene, die durch die Porphyrin-Stickstoffatome aufgespannt wird, beim α-Oxyhämoglobin noch 0.13 Å außerhalb in Richtung proximales Histidin. Beim β-Oxyhämoglobin ist das Eisenatom bereits um -0.08 Å durch die Stickstoff-Ebene durchgezogen in Richtung Sauerstoffmolekül[13]. Auch im Methämoglobin befinden sich die Eisen-III-Zentralatome der Untereinheiten näher an der Porphyrinringebene als die Eisen-II-Atome im fünffach koordinierten Deoxyhämoglobin: Abstand in der α-Kette 0.07 Å, in der β-Kette 0.21 Å[16].

Beim Übergang vom T- zum R-Zustand werden polare Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen an den Enden der Globinketten geschwächt oder vollständig aufgehoben. Die Neubildung dieses Bindungssystems ist die treibende Kraft beim umgekehrten Vorgang, dem R → T-Übergang, d.h. der Freisetzung des gebundenen Sauerstoffs. Allosterische Effektoren, die diesen Übergang begünstigen, sind Protonen, Chloridionen, 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) und Kohlendioxid. Deoxyhämoglobin kann über die N-terminalen Aminogruppen der Globinketten mit CO_2 zu Carbamaten reagieren[8]. Auf diese Weise wird ein Großteil des Stoffwechselendprodukts Kohlendioxid vom Gewebe über die Venen zur Lunge transportiert und dort ausgeschieden.

Versuche, die Reihenfolge der Sauerstoff-Aufnahme durch die vier Untereinheiten des Hämoglobins zu bestimmen, sind bisher fehlgeschlagen. Es wird allgemein angenommen, daß zuerst die α-Einheiten Sauerstoff binden, da die Aktivzentren der β-Einheiten sterisch etwas stärker geschützt sind. Diese Frage sollte durch Röntgenfeinstrukturanalyse von partiell oxygenierten Hämoglobinkristallen geklärt werden, die aus Polyoxyethylen erhalten wurden[11]. Diese Arbeit führte zu einer beträchtlichen Verwirrung in der Diskussion des Problems, hervorgerufen durch unpräzise Definitionen der Porphyrinebene, auf die sich der Abstand zum Eisenzentralatom bezieht. Durch die Wölbung des Porphyrinsystems zum proximalen Histidin entstehen zwei mögliche Bezugsebenen: die Ebene der Stickstoffatome des Porphyrins (die Abstandsangaben beim Oxyhämoglobin beziehen sich auf diese Ebene[13]) und die Ebene des Porphyrinrings selbst, die die beste gemittelte Ebene durch alle Porphyrinringatome darstellt (auf diese Ebene sind alle anderen Abstandsangaben im Text bezogen).
Berücksichtigt man diese unterschiedlichen Zuordnungen, so stehen die Ergebnisse aus der Strukturanalyse des partiell oxygenierten Hämoglobins im Einklang mit den bisher entwickelten Vorstellungen über den Mechanismus der Sauerstoff-Fixierung und die Stereochemie am Eisen-II-Zentralatom im Hämoglobin.

1.2.3. Hämerythrine

Meerwürmer benützen eisenhaltige Proteine als Sauerstoffträger und Speichermoleküle, die keine Porphyrine enthalten. Die meisten Hämerythrine sind Oktamere mit identischen α-Helix-Untereinheiten und zwei Eisenatomen pro Molekül. Jedes Eisenatom ist von 4 α-Helixsegmenten umgeben, die sich aus jeweils 113 Aminosäuren zusammensetzen. Die Eisenatome sind dreifach miteinander verknüpft: über eine μ-

oxo-Brücke und über die Carboxylgruppen der Seitenketten von Glutaminsäure 58 und Asparaginsäure 106. Die Eisenzentralatome sind nicht äquivalent. Die oktaedrische Koordination des ersten wird hergestellt durch drei Histidin-Liganden, am anderen Eisenatom koordinieren zwei Histidine, die sechste Koordinationsstelle bleibt frei im Methämerythrin bzw. wird von Sauerstoff besetzt im Oxyhämerythrin. Das Bindungsverhältnis Eisen:Sauerstoff beträgt also 2:1[1,18,19].

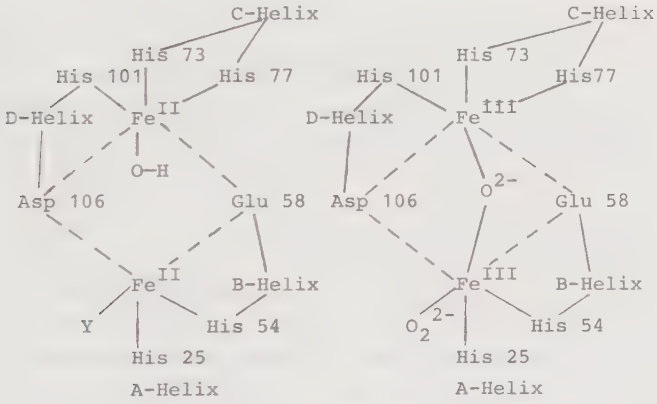


Abb. 9: Aktivzentrum des Deoxy-[20] und Oxyhämerythrins[21]
Y = $OH^{\ominus}$ oder Phenolat aus Tyr 109

Im Oxyhämerythrin wird in wesentlich stärkerem Maße als im Oxyhämoglobin Elektronendichte vom Metall in die antibindenden π*-Orbitale des Sauerstoffs übertragen. Die Sauerstoffbindung bleibt jedoch reversibel, da die Protein-

matrix für die Bindungsstelle des Sauerstoffs am Aktivzentrum einen hydrophoben Tunnel bildet[22].
Die Strukturuntersuchungen konnten inzwischen durch Synthese von niedermolekularen Modellkomplexen bestätigt werden[23]. Die Sauerstoffaffinität des Hämerythrins ist nicht abhängig vom pH-Wert im Bereich zwischen 6 und 9. Dies könnte erklärt werden mit einer Protonenübernahme des gebundenen Peroxids von dem Y-Liganden eines Deoxyhämeryhtrin-Moleküls[24].

1.2.4. Hämocyanine

Die blaue Farbe des Plasmas der Tintenfische, Hummer, Schnecken und Spinnen wird hervorgerufen durch ihre sauerstofftragenden Hämocyanin-Pigmente. Wie die Hämerythrine enthalten sie keine Porphyrinsysteme. Sie weisen keine identischen Untereinheiten auf; die Molmassen verschiedener isolierter Hämocyanine variieren stark von 400 000 bis 9 000 000[1,20].
Die Quartärstruktur des Hämocyanins der Vogelspinne Eurypelma californicum setzt sich zusammen aus 23 Untereinheiten. Durch Rekonstitutionsversuche konnten sie in 7 Typen eingeteilt werden, die sich in Kettenlänge und Aminosäurenzusammensetzung unterscheiden[25]. Jede Untereinheit ist in der Lage, ein Molekül Sauerstoff zu binden. Die Quartärstruktur verleiht dem Hämocyanin-Molekül kooperative Eigenschaften. Das sauerstoffbindende Zentrum jeder Untereinheit enthält zwei Kupferatome, Cu-I im Deoxyprotein und Cu-II im Oxyhämocyanin. Der Sauerstoff im Oxyhämocyanin bildet wahrscheinlich eine μ-peroxo-Brücke zwischen den Kupferatomen[18]. Für das Aktivzentrum wurde eine Struktur vorgeschlagen, in der jedes Kupferatom über zwei koordinierte Histidin-Imidazolreste an der Peptidkette fixiert ist, die jeweils dritte Koordinationsstelle nimmt die μ-peroxo-Brücke ein, die vierte Koordinations-

stelle könnte ein ebenfalls überbrückendes Phenolatanion einer Tyrosinseitenkette[26] oder ein Hydroxid-Anion einnehmen. Eine dieser Modellvorstellung entsprechende Aminosäuresequenz His-His-Trp-His-Trp-His wurde aus den Untereinheiten des Vogelspinnen-Hämocyanins isoliert[27]. In einer neueren Modellvorstellung für das Aktivzentrum im Oxyhämocyanin der Vogelspinnen wird eine Koordination der beiden Kupferatome durch insgesamt sechs Histidinreste vorgeschlagen, die über einen größeren Kettenabschnitt der Peptidkette verteilt sind[28].

2. Synthetische Sauerstoffträger

Beim Entwurf von Modellsystemen für Sauerstoff-Komplexverbindungen muß darauf geachtet werden, daß eine Reihe von Kriterien erfüllt sind:

- die Stereochemie an der prosthetischen Gruppe des Modells sollte den Verhältnissen im biologischen Vorbild entsprechen
- als fünfter Ligand am Eisen-Zentralatom sollte ein heterocyclisches Amin als Stickstoff-Base die Funktion des proximalen Histidins übernehmen
- das System muß wasserlöslich sein; dieses Kriterium kann auch durch Einlagerung in wasserlösliche, hochmolekulare Substanzen erfüllt werden
- das Aktivzentrum muß durch eine hydrophobe Umgebung geschützt werden um die durch Protonen katalysierte Oxidation zu verhindern
- die bimolekulare Autoxidation, die man bei allen ungeschützten Eisen-II-Komplexen findet, muß verhindert werden
  (eine eingehende Besprechung der Oxidationsmechanismen folgt in Kapitel 3.).

Die Einführung stereochemischer Schutzfunktionen ist daher ein Merkmal aller Modellverbindungen. Zur Stabilisierung der Sauerstoffkomplexe kommen unterschiedliche Konzepte zur Anwendung[29-32].

2.1. Monomolekulare Modellverbindungen

Die erste synthetische Eisen-II-Komplexverbindung, die bei tiefen Temperaturen reversibel oxygenierbar war, war kein Porphyrin sondern ein Oktaazamakrozyklus. Die Verbindung wurde 1973 von Baldwin und Huff beschrieben[33]. Eine Weiterentwicklung dieses Komplexes stellt in gewisser Hinsicht ein Eisen-II-tetraazamakrobizyklus dar[34,35], der in Abwesenheit von Wasser bei Raumtemperatur reversibel oxygenierbar ist.

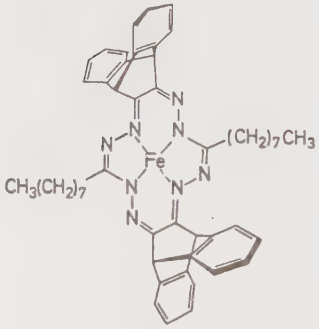
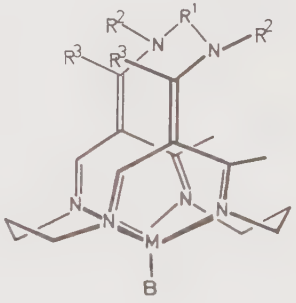


Abb. 10: Eisen-II-Oktaazamakrozyklus, Baldwin 1973[33]



Eisen-II-Tetraazamakrobizyklus, Busch 1983[34] M = Fe^{2+}, B = CH_3-CN, R^1 = meta-Xylylen-, R^2 = Benzyl-, R^3 = Phenyl-

Bei einer großen Anzahl synthetischer monomolekularer Modellverbindungen auf der Basis von Eisen-II-Porphyrinsystemen wird das Zentralatom durch sperrige Substituenten vor Dimerisierung und Autoxidation geschützt. Das "picket-fence" Porphyrin (Abb. 11) ist gelöst in Benzol bei 25°C reversibel oxygenierbar. Das koordinierte Sauerstoff-Molekül wird durch die o-Pivaloylamidophenylgruppen geschützt. An der ungeschützten Seite des Porphyrinrings koordiniert eine Stickstoff-Base, z.B. 1-Alkylimidazol, die in großem Überschuß vorliegen muß, damit eine μ-oxo-Dimeren-Bildung auf dieser Seite verhindert wird. Der Basenüberschuß wird im "tailed-picket-fence" Porphyrin vermieden durch die Einführung eines kovalent gebundenen fünften Liganden am Eisen-II-Zentralatom.

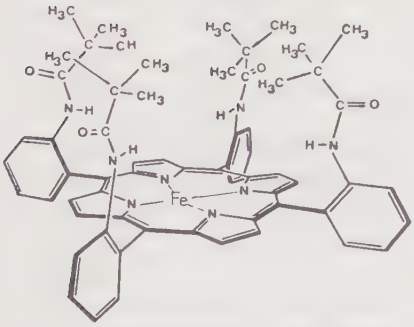
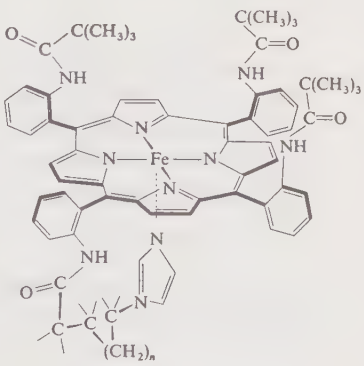
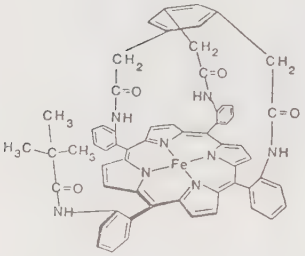


Abb. 11: Eisen-II-"picket-fence"-Porphyrin
Collman 1973[36)]



Eisen-II-"tailed-picket-fence"-Porphyrin
Collman 1980[37)]

Im "pocket"-Porphyrin (Abb. 12) wurde der sterische Schutz weiterentwickelt. Die lineare CO-Koordination ist stark behindert, während die gewinkelte Sauerstoff-Bindung nicht beeinträchtigt wird. Mit ähnlichen Zielsetzungen sind eine Reihe überbrückter Porphyrinsysteme[39,40,42] (ein Beispiel in Abb. 12) und doppelt überbrückter Porphyrinsysteme[41,42] synthetisiert worden.



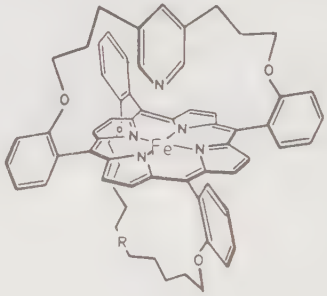
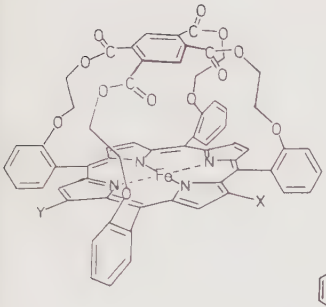


Abb. 12: Eisen-II-"pocket"-Porphyrin, Collman 1983[38]

Eisen-II-"basket-handle"-Porphyrin, Momenteau 1985[42]

Einen geschlossenen Käfig für das Sauerstoff-Molekül weisen das "capped"-Porphyrin und seine Weiterentwicklung mit kovalent gebundener Stickstoffbase auf.



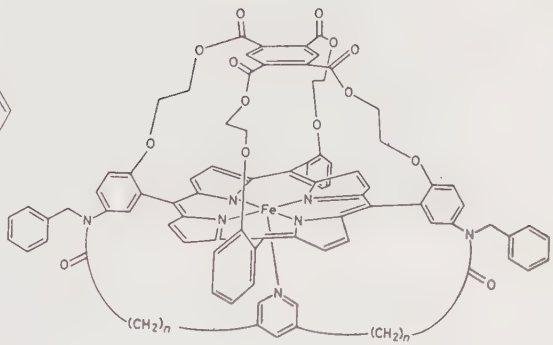
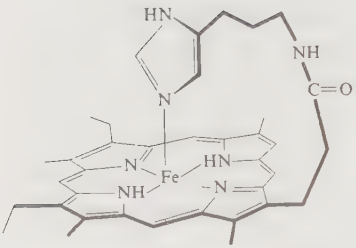


Abb. 13: Eisen-II-"capped"-Porphyrin, Baldwin 1975[43)]

Eisen-II-"capped-strapped"-Porphyrin, Baldwin 1984[44)]

Stärker am natürlichen Vorbild orientiert ist das Modell von Chang und Traylor, ein peripher modifiziertes Häm, in dem der kovalent gebundene basische Ligand das proximale Histidin am Aktivzentrum des Myoglobins imitieren soll (Abb. 14). Das System kann einen reversiblen Sauerstoffkomplex in Methylenchlorid nur bei -45°C bilden[45)].

Modellsysteme für die sterischen Verhältnisse auf der distalen Seite der Hämoproteine stellen die Anthracen-Häm-Cyclophane und verwandte Komplexe dar.



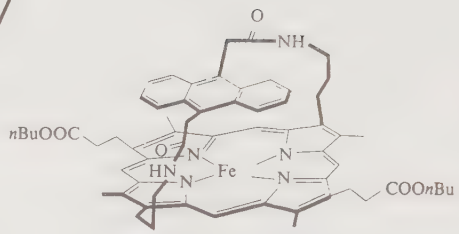


Abb. 14: "chelated heme", Chang and Traylor 1973[32,46] "anthracene heme cyclophane", Traylor 1985[32,47]

2.2. Polymerverknüpfte Modellverbindungen

Ein weiterer Ansatz zur Stabilisierung von reversiblen Sauerstoffkomplexen ist die Immobilisierung der Porphyrinsysteme an festen Trägern, wie Polystyrol[48] oder Kieselgel[49]. Im festen oder matrixgebundenen Zustand bleiben die Aktivzentren voneinander getrennt. Die bimolekulare Autoxidation kann so verhindert werden.

Die Verwendung von löslichen Polymeren als Trägersubstanzen ist eine wichtige Weiterentwicklung des Konzepts der Immobilisierung. Dabei werden Porphyrine koordinativ an synthetische Polymere gebunden, wie z.B. an Polyoxyethylen-(styrol-N-vinylimidazol)-Copolymer[50] oder Poly(1-vinyl-2-methylimidazol)[51]. Durch Einlagerung im Polymerknäuel kann die unerwünschte Neigung der Porphyrine zur Aggregation in Lösung unterdrückt werden.

Ein größtmöglicher Schutz vor Dimerisierung kann erreicht werden, wenn über die Peripherie des Porphyrinsystems eine kovalente Bindung zum Polymer geknüpft wird. Polystyrol[52], Polyethylenimin[53], Polyvinylpyrrolidon[53,54], Polyoxyethylen[55] und Polyurethane[53] finden als polymere Träger Verwendung. Werden als Porphyrinkomponenten Derivate des Eisen-II-Protoporphyrins IX eingesetzt, erhält man "Hämopolymere" mit prosthetischen Gruppen, die strukturell mit den Aktivzentren der natürlichen Vorbilder sehr eng verwandt sind.

In den synthetischen Hämopolymeren übernimmt das Polymer zwei wichtige Aufgaben, die in den natürlich vorkommenden Proteinen von der Proteinkomponente erfüllt werden: Solubilisierung und Schutz der prosthetischen Gruppe. Die Verwendung wasserlöslicher Polymere als Träger ermöglicht die Untersuchung der Sauerstoffkomplexe der Hämopolymere in wässrigem Milieu, den physiologischen Bedingungen im Blut entsprechend. Die Funktion des proximalen Histidins übernimmt im Hämopolymer POE-Gly-His-Häm-API (Abb. 15) das 3-(1-Imidazol)-propylamin (API), das kovalent an eine Propionsäuregruppe des Porphyrins gebunden ist. Die zweite Propionsäuregruppe ist mit der freien Aminogruppe des wasserlöslichen Polymerpeptids POE-Gly-His-NH_2 verknüpft, wobei das Histidin die distale Imidazol-Koordination imitiert. Das Hämopolymer ist in Phosphatpuffer bei Raumtemperatur reversibel oxygenierbar, schon nach wenigen Oxygenierungszyklen tritt jedoch vollständige Oxidation des Hämeisens zum inaktiven Eisen-III ein[53].

Der Einbau einer apolaren Peptidbrücke zwischen Polymer und Porphyrin bringt keine durchgreifende Verbesserung[56,57]. Auch eine erheblich verbesserte Imitation der Aminosäureumgebung im natürlichen Vorbild kann die irreversible Oxidation nicht verhindern[58].

Der distale Schutz des Aktivzentrums könnte durch die Verwendung von Polyaminosäuren verbessert werden, da diese

im Gegensatz zu den meisten synthetischen Makromolekülen in Lösung eine Sekundärstruktur ausbilden. Das Polymerpeptid POE-Gly-Val_7-NH_2 bildet eine Faltblattstruktur aus. Der verstärkte distale Schutz in den entsprechenden Hämopolymeren ist aber verbunden mit dem Verlust der guten Wasserlöslichkeit[59]. Auch bei modifizierten "tailed-picket-fence"-Porphyrinen, die durch Verknüpfung mit wasserlöslichen Polymeren solubilisiert wurden, konnte die irreversible Oxidation nicht verhindert werden[60].

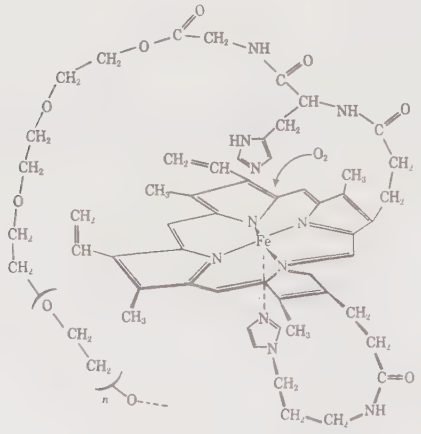
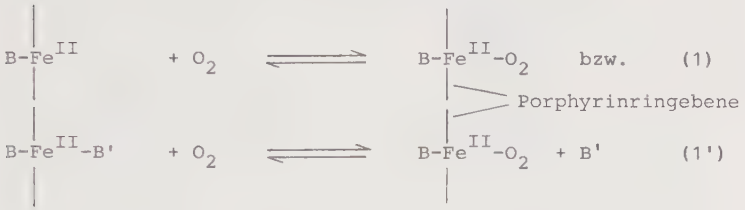


Abb. 15: Hämopolymer POE-Gly-His-Häm-API[55]

3. Oxidationsmechanismen

Die reversible Oxygenierung kann formuliert werden als



B, B': axiale Liganden

Nachdem Paulings Vorhersage einer gewinkelten "end-on" Sauerstoff-Bindung in Oxyhämoglobin und Oxymyoglobin bestätigt wurde[61], wurde in der Literatur eine ausgedehnte Kontroverse darüber ausgetragen, ob der Sauerstoff-Komplex als Eisen-II-Sauerstoff- oder als Eisen-III-Hyperoxid-Komplex zu betrachten sei:

Sauerstoff bindet als σ-Donor-, π-Akzeptor-Ligand am Metall, das eine ausreichende Elektronendichte für eine π-Rückbindung aufweist, die durch die Stickstoff-Porphyrin-Liganden noch erhöht wird. Die Schwierigkeiten entstehen aus der eingeschränkten Aussagekraft der Strichformel, die weder die korrekte Bindungsordnung zwischen den Sauerstoffatomen noch das Ausmaß der π-Rückbindung vom Eisen berücksichtigen kann.

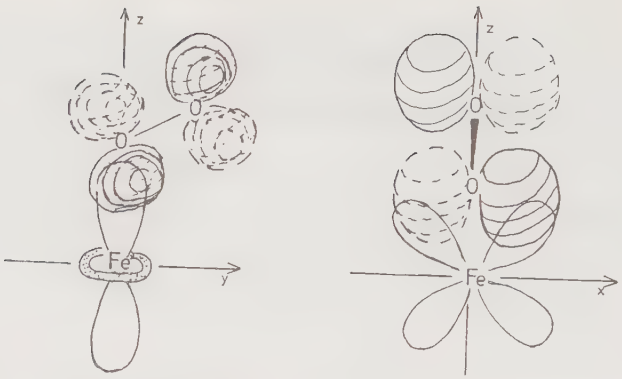


Abb. 16: Metall-Sauerstoff-σ-Bindung und Metall-Sauerstoff-π-Bindung

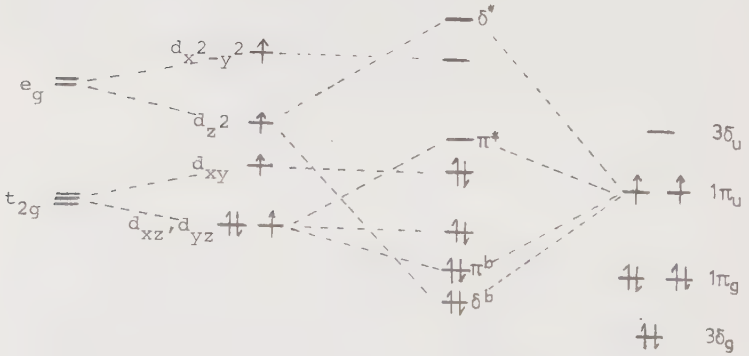
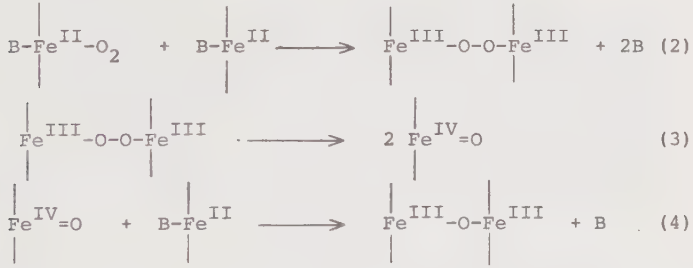


Abb. 17: Molekülorbitaldiagramm für den Eisen-II-Sauerstoff-Komplex[62)]

Das MO-Diagramm ist stark vereinfacht, denn die Auswirkungen der Wechselwirkungen des Eisenions mit dem Porphyrin-Liganden und der koordinierten Imidazolbase sind der Übersichtlichkeit halber vernachlässigt.

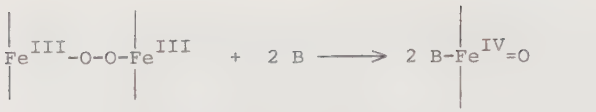
3.1. Dimerer Autoxidationsmechanismus

Die räumliche Trennung der Aktivzentren ist die Gemeinsamkeit aller im vorigen Kapitel vorgestellten Modellverbindungen, die mit Sauerstoff bei Raumtemperatur stabile Komplexe bilden können. Bei Eisen-II-Porphyrinkomplexen ohne Schutz vor Dimerisierung kann die Oxidation in aprotischen Lösungsmitteln durch Absenken der Temperatur auf Werte um -40°C verlangsamt werden. Der bimolekulare Oxidationsmechanismus ist und wird noch immer sehr eingehend untersucht.



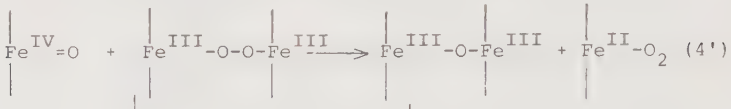
Für die Oxidation von Porphyrinsystemen ohne axialen Liganden B konnten die postulierten Spezies μ-Peroxo-Dimer[63,64], Ferryl-Zwischenstufe[65,66] und μ-Oxo-Dimer[67] NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

Erst in allerjüngster Zeit gelang der Nachweis der $(Fe^{IV}=O)^{2+}$-Einheit in Ferryl-Porphyrin-Komplexen mit axialem Amin und in Ferryl-Myoglobin[68], sodaß Gleichung (3) ergänzt werden kann für Systeme in Gegenwart axialer Liganden.

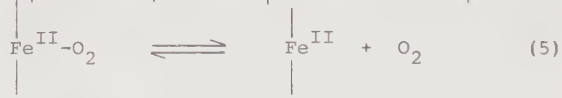


(3')

Gleichung (4) stellt eine Vereinfachung dar[69]:



(4')



(5)

(6)

3.2. Protonenkatalysierter Oxidationsmechanismus

Bei Eisen-II-Sauerstoffkomplexen, die in protischen Lösungsmitteln haltbar sein sollen, muß das Sauerstoffmolekül durch eine hydrophobe Umgebung vor der durch Protonen katalysierten Oxidation geschützt werden:

(7)

Aus dem Redoxpotential für das Redoxpaar Sauerstoff/Hyperoxid-Anion

(8)

geht hervor, daß in Abwesenheit von Protonen Sauerstoff nur ein schwaches Oxidationsmittel ist. Bei Anwesenheit von Protonen dagegen wird das Oxidationspotential des Sauer-

stoffs stark erhöht. Das Sauerstoff-Molekül wird im Extremfall zum Wasser reduziert:

$$O_2 + 4\,H^{\oplus} \rightleftharpoons 2\,H_2O \qquad E^{O} = +0.79\ V \qquad (9)$$

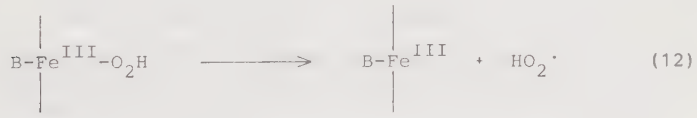
(pH 7.4, 25°C, gegen Normalwasserstoffelektrode)

Diese 4-Elektronen-Reduktion läuft jedoch nicht in einem Schritt ab, sondern als Folge von 1-Elektronen-Reduktionen:

$$O_2 + H^{\oplus} + e^{\ominus} \rightleftharpoons HO_2\cdot \qquad E^{O} = -0.32\ V \qquad (10)$$

$$HO_2\cdot + H^{\oplus} + e^{\ominus} \rightleftharpoons H_2O_2 \qquad E^{O} = 1.68\ V \qquad (11)$$

Aus Gleichung (10) kann entnommen werden, daß für das Redoxpaar Sauerstoff/Hyperoxid-Radikal die Erhöhung des Redoxpotentials gegenüber Sauerstoff/Hyperoxid-Anion gering ausfällt. Eine Protonenübertragung auf ein koordiniertes Sauerstoff-Molekül ist daher für ein Eisen-Porphyrinsystem erträglich, wenn die Dissoziation des Hyperoxid-Radikals verhindert wird, wie wahrscheinlich im Oxyhämerythrin durch einen hydrophoben Tunnel (vgl. Kapitel 1.2.3.).

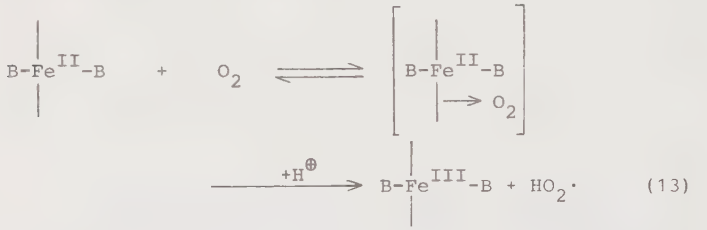


(12)

3.3. "Outer-Sphere"-Oxidationsmechanismus[70)]

Dieser Oxidationsmechanismus kann die Reaktion von Sauerstoff mit hexakoordinierten Eisen-II-Porphyrinkomplexen erklären, auch wenn Sauerstoff als relativ schwacher Ligand

nicht in der Lage ist, einen der beiden axialen Liganden zu verdrängen. Sauerstoff kann jedoch unter bestimmten Umständen mit dem Porphyrinring einen π-Akzeptor-Komplex bilden. Protonierung in wässrigem Milieu, Elektronentransfer und Dissoziation führen zum Hyperoxid-Radikal und dem Eisen-III-Porphyrin, das nach wie vor sechsfache Koordination aufweist. Ob dieser Mechanismus ablaufen kann, hängt allerdings stark von der Elektronendichte, d.h. von den Substituenten am Porphyrinring und von der Natur der beiden axialen Liganden ab.



(13)

4. Dextran-Hämopolymere

Durch die Synthese von imitierenden Modellsystemen konnten wichtige Fortschritte im mechanistischen Verständnis des Sauerstofftransports und der Sauerstoff-Fixierung durch Hämoglobin und Myoglobin erzielt werden. Bei den bisher entwickelten polymerverknüpften Modellen wurden synthetische Polymere als Ersatz des Globins verwendet, wobei die Solubilisierung der meist wasserunlöslichen Porphyrinsysteme und die räumliche Trennung der Aktivzentren die primären Syntheseziele waren. Bei der Syntheseplanung der Dextran-Hämopolymere wurde als zusätzliches Kriterium die Forderung nach guter physiologischer Verträglichkeit berücksichtigt. Die Dextran-Hämopolymere sind synthetische Modellverbindungen, die sich aus natürlich vorkommenden Bausteinen zusammensetzen. Sowohl die Polymerkomponente

als auch der proximale Ligand sind kovalent an das Häm-Aktivzentrum gebunden, während in den natürlichen Vorbildern Hämoglobin und Myoglobin das Häm-Aktivzentrum koordinativ fixiert ist. Die kovalente Bindung des proximalen Liganden an der Peripherie des Porphyrins hat den Vorteil, daß die Basizität genau auf die gewünschte Koordination des Sauerstoffs an der gegenüberliegenden axialen Koordinationsstelle des Eisenions abgestimmt werden kann, ohne daß ein Ligand im Überschuß eingesetzt werden muß. Die kovalente Fixierung am Polymer ist notwendig, da nicht-kovalent gebundene Komplexe vor allem in wässrigem Medium keine ausreichende Stabilität aufweisen. Außerdem ist die Einheitlichkeit der Komplexierung in koordinativ gebundenen Systemen nicht gegeben, sodaß die spektroskopische Untersuchung der Komplexe stark gestört und die Aussagekraft der Modellsysteme stark eingeschränkt ist.

4.1. Synthese der Dextran-Hämopolymere

4.1.1. Dextran als polymerer Träger

4.1.1.1. Eigenschaften und Verwendung als Blutplasmaexpander

Dextrane sind Polysaccharide mit der Bruttoformel $[C_6H_{10}O_5]_n$. Sie bestehen aus nahezu linearen Ketten von D-Glucopyranoseringen, die α-(1,6)-glucosidisch miteinander verknüpft sind. α-(1,3) und α-(1,4) Verknüpfungen als Ansatzpunkte von Seitenketten treten abhängig vom Typ des zur Synthese verwendeten Bakteriums mit etwa 3-4 prozentiger Häufigkeit auf.

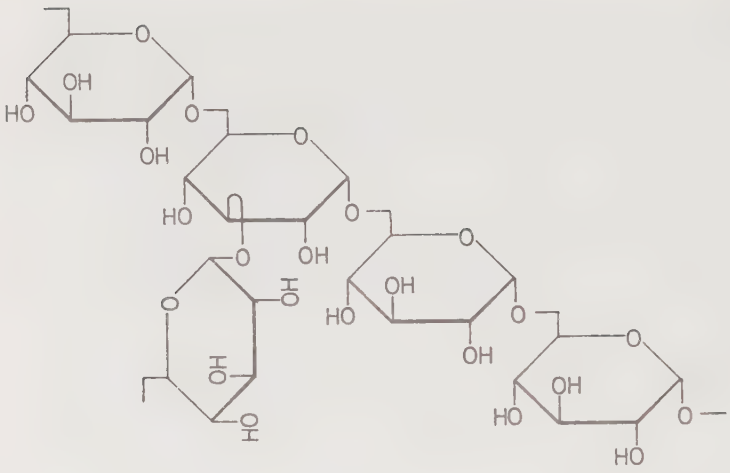


Abb. 18: Ausschnitt aus einem Dextran-Molekül mit einer Seitenkette, die α-(1,3)glucosidisch mit der Hauptkette verbunden ist

Streptococcaceae-Bakterien der Art Leuconostoc mesenteroides bauen auf saccharosehaltigen Nährböden das Polysaccharid Dextran aus dem Glucoseanteil der Saccharose unter Freisetzung von Fructose auf. Die Polymerisationsreaktion wird durch ein extrazelluläres Bakterienenzym bewirkt, durch das Protein Dextransaccharase[71]. Natives Dextran weist Molmassen zwischen 40 und 50 Millionen auf[72]. Der Abbau zu physiologisch verträglichen Dextranen mit mittleren Molmassen zwischen 40 000 und 60 000 erfolgt durch partielle Hydrolyse mit Mineralsäuren oder enzymatisch. Diese Dextranfraktionen sind gut wasserlöslich, nichttoxisch und können leicht biologisch abgebaut werden.

Dextran-Lösungen haben große Bedeutung als Blutplasmaersatzstoffe erlangt. Nach intravenöser Infusion können Dextranlösungen ein vermindertes Blutvolumen für einige Zeit normalisieren und die plasmatischen Blutanteile ersetzen. Dextranlösungen können den klinischen Anforderungen weitgehend entsprechen, weil die α-1,6-glucosidischen Bindungen im linearen Dextranmolekül durch die α-Amylase des Körpers nicht gespalten werden. Dadurch ist eine ausreichende Verweildauer im Kreislauf gegeben. Der größte Teil des infundierten Dextrans wird durch die Nieren innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden. Leber, Milz und Nieren des Menschen enthalten Dextranglucosidase, die die 1,6- und 1,3-Bindungen des Dextrans spalten kann.
Der Molmassenbereich klinisch einsetzbarer Dextrane reicht von 30 000 bis 80 000. Oberhalb dieser Molmassengrenze können Dextrane wie auch andere makromolekulare Stoffe Aggregationen der Erythrocyten und Thrombocyten herbeiführen. Unterhalb eines Molgewichts von 30 000 fällt die Plasmaexpanderwirkung wegen zu rascher Eliminierung ab[73]. Um Pyrogenfreiheit zu gewährleisten, wird der gesamte Herstellungsprozeß unter sterilen Bedingungen durchgeführt.
Um die Funktionen des Plasmaexpanders um die Sauerstoffträgerfunktionen zu erweitern, wurden Versuche unternommen, Hämoglobin kovalent an klinische Dextrane zu binden[74,75]. Durch die Verknüpfung sollte die Verweildauer des Hämoglobins im Kreislauf erhöht werden. Die dextrangebundenen Hämoglobine wiesen jedoch eine erhöhte Sauerstoff-Affinität auf und waren nicht mehr in der Lage, den Sauerstoff an das Myoglobin im Muskelgewebe abzugeben.
Dextranderivate finden auch Anwendung als Trägersubstanzen für pharmazeutische Präparate und als Arzneimittelzusätze.

Lediglich drei Lösungsmittel sind für Dextrane bekannt: Wasser, Dimethylsulfoxid und Formamid. Dextrane sind

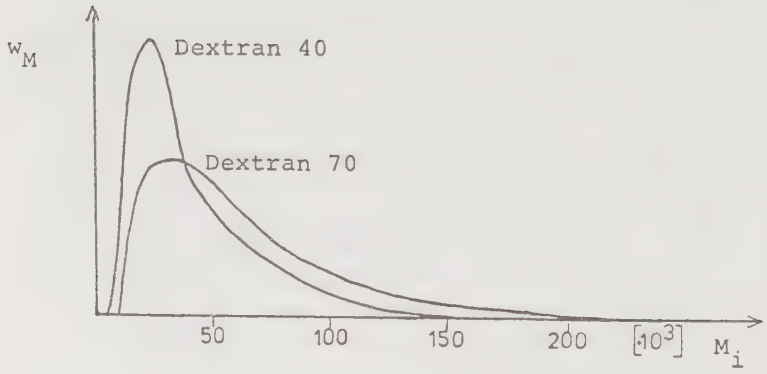


Abb. 19: Differentielle Massenverteilung w(M)

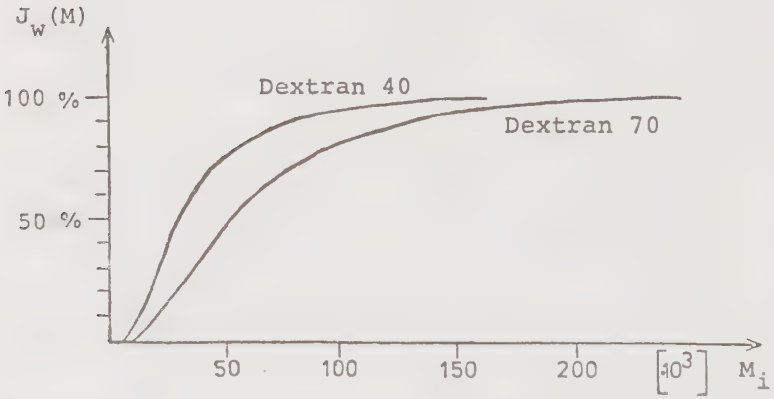


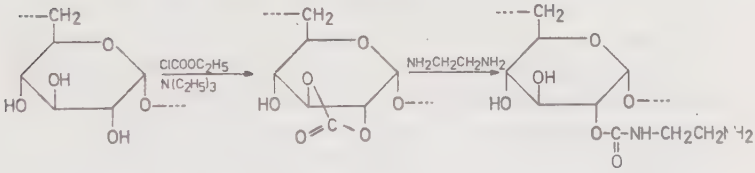
Abb. 20: Integrale Massenverteilung $J_w(M)$

säurelabil; sie unterliegen leicht der Hydrolyse ihrer (1,6)-Bindungen, wobei Dextrane mit niedrigerer Molmasse entstehen. Die Molmassenverteilungen von zwei neben anderen in dieser Arbeit verwendeten Dextranfraktionen sind in den Abbildungen 19 und 20 wiedergegeben.

Für die im folgenden beschriebene Synthese der Hämopolymere wurde eine Dextranfraktion verwendet, für die der Viskositätsmittelwert der Molmasse mit M = 44 800 bestimmt wurde. Angaben zur Molmasse beziehen sich daher auf die Methode der Bestimmung der Grenzviskosität.

4.1.1.2. Funktionalisierung von Dextran

Dextran kann unter relativ schonenden Bedingungen selektiv am C-Atom 2 unter Ringerhaltung funktionalisiert werden.



Mit Chlorameisensäureethylester in Gegenwart von Triethylamin in Dimethylsulfoxid entsteht aus den trans-Hydroxylgruppen an den C-Atomen 2 und 3 der Glucopyranose-Einheit ein cyclischer Kohlensäurediester, der als Dextran-Carbonat bezeichnet wird[76,77]. Dextran-Carbonat ist eine sehr reaktive Verbindung. Die Umsetzung mit Ethylendiamin in einem Dimethylsulfoxid/Wasser-Gemisch führt unter Öffnung des

trans-Carbonat-Ringes zu 2-Oxycarboxyaminoethylamin-poly-1,6-α-D-Glucose, vereinfachend bezeichnet als Aminodextran[78].

Die Reaktion kann IR-spektroskopisch verfolgt werden. Das IR-Spektrum des Dextran-Carbonats zeigt die für pentacyclische Kohlensäurediester-Gruppierungen charakteristische Carbonyl-Absorption bei 1800 cm^{-1}. Die Bildung eines acyclischen Diesters kann ausgeschlossen werden, da die für eine solche Gruppierung zu erwartende Carbonylabsorption bei 1750 cm^{-1} völlig fehlt. Die selektive Bindung des Diesters mit den Hydroxylgruppen an den C-Atomen 2 und 3 ist durch Modellstudien an monosaccharidischen Analoga belegt[76]. Die Ringöffnung bei der Aminolyse des Kohlensäurediesters erfolgt in der Richtung, daß die entstehenden Dextran-Derivate hauptsächlich am C-Atom 2 funktionalisiert sind[76,78]. Die Reaktionsbedingungen müssen so gewählt werden, daß die Aminolyse quantitativ erfolgt, d.h. die IR-Absorption bei 1800 cm^{-1} muß völlig verschwinden. Im anderen Falle kann als Nebenreaktion die Alkoholyse nicht umgesetzter trans-Carbonat-Ringe durch Hydroxylgruppen von benachbarten Dextranketten auftreten. Dies führt zu vernetzten Produkten, die gegenüber den linearen Dextran-Derivaten eine erheblich verringerte Löslichkeit aufweisen.

Aminodextran ist eine stabile Verbindung. Sie kann bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt werden und unterliegt im Gegensatz zu Dextran-Carbonat keinen Alterungsprozessen.

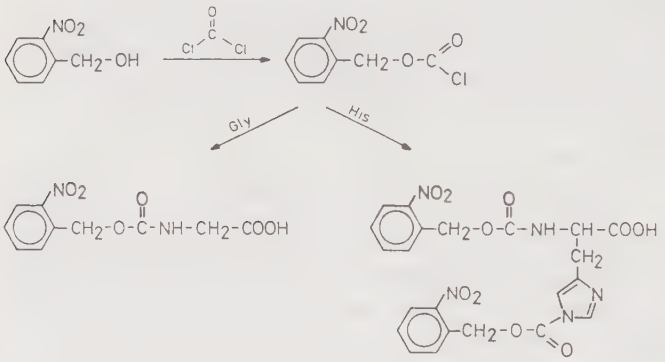
Zur Bestimmung des Substitutionsgrades wurde die primäre Aminogruppe des Aminodextrans mit 2,4-Dinitrofluorbenzol umgesetzt. Das UV-Spektrum des Dinitrophenyl-Derivats weist ein Absorptionsmaximum bei 364.2 nm auf. Mit bekanntem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 17\,400$ L/mol cm[79] kann über das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration an freien Aminogruppen C_{NH_2} bestimmt werden. Für das zur

weiteren Synthese der Hämopolymere verwandte Aminodextran wurde der Quotient aus C_{NH_2} und der Einwaage, d.h. die Anzahl der freien Aminogruppen pro Dextran-Molekül, mit 12.9 errechnet. Das mittlere Molekulargewicht pro freier Aminogruppe beträgt 3 490. Damit beträgt der Substitutionsgrad γ = 4.6 %, im Mittel ist jeder 22. Anhydroglucose-Rest des Dextrans substituiert.
Die Elementaranalyse dieses Aminodextrans ergibt 0.77 % Stickstoff. Dies entspricht einer Zahl von 12.4 Aminogruppen pro Dextran-Molekül oder einem Substitutionsgrad von 4.5 %. Dies bedeutet eine gute Bestätigung der Werte, die durch die DNP-Derivatisierung erhalten wurden.

4.1.1.3. Kupplung mit N-terminal geschützten Aminosäuren

Der eingeführte Spacer mit einer primären Aminogruppe als Terminus kann mit N-geschützten Aminosäuren verlängert werden, die das Bindeglied zwischen Polymer und Porphyrin darstellen. Durch Variation der Aminosäuren können unterschiedliche Koordinationsverhältnisse am Zentralatom des Porphyrins nach erfolgtem Zusammenbau der Komponenten des Hämopolymers erreicht werden.
Die Eigenschaften des Dextrans reduzieren die Zahl der möglichen Schutzgruppen für die zu kuppelnden Aminosäuren erheblich. Schutzgruppen, die in saurem Medium abgespalten werden müssen, können nicht verwendet werden, da Dextran nicht säurestabil ist. Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure führt zum Zusammenbruch der Polysaccharidkette[80]. Die photochemische Abspaltung der Ddz-Schutzgruppe eines Dextran-Glycin-Ddz-Derivats führt zur Abspaltung der gesamten Seitenkette vom Polymer[81]. Um diese Spaltung zu vermeiden, wurde als Schutzgruppe die o-Nitrobenzyloxycarbonyl-Gruppe (NBOC)[82] gewählt. Sie kann unter sehr milden Bedingungen abgespalten werden. Die anderen Teile des Moleküls werden nicht beeinträchtigt.

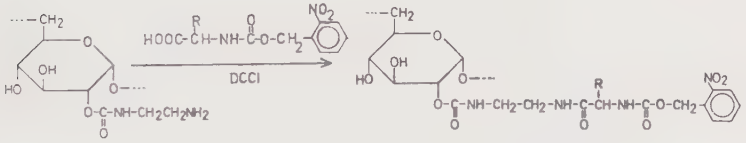
Die Darstellung der N-geschützten Aminosäuren NBOC-Glycin und N(α), N(Im)-di-NBOC-L-Histidin erfolgt nach der Säurechloridmethode[83]. Aus o-Nitrobenzylalkohol und Phosgen in Dioxan erhält man den Chlorameisensäure-o-nitrobenzylester, der unter Schotten-Baumann-Bedingungen mit der Aminosäure reagiert.



Die beiden Verbindungen werden charakterisiert durch ihre ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren (vgl. experimenteller Teil). Aus den Spektren des Di-NBOC-His geht hervor, daß die beiden Schutzgruppen nicht äquivalent sind. Die Benzylprotonenresonanz der Imidazolschutzgruppe ist um 0.41 ppm nach tieferem Feld verschoben als die Resonanz der N(α)-Schutzgruppe. Im ^{13}C-NMR-Spektrum unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der Benzyl-C-Atome um 3.9 ppm, die der Carbonyl-C-Atome um 1.8 ppm, während die Aufspaltung der Resonanzsignale der aromatischen C-Atome erst im gespreizten Spektrum sichtbar wird.
Die Imidazolschutzgruppe im Di-NBOC-His kann sehr leicht abgespalten werden. Schon beim Umkristallisieren aus

Essigester/Petrolether besteht bei Raumtemperatur die Gefahr der Abspaltung mit allen negativen Auswirkungen, z.B. auf die Löslichkeit, die von den Histidin-Derivaten mit ungeschützter Imidazol-Funktion ausgehen.

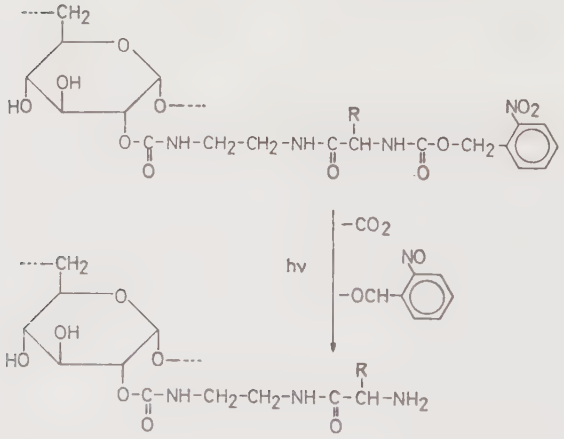
Die Kupplung der N-geschützten Aminosäuren an den Spacer des polymeren Trägers erfolgt mit der Carbodiimid-Methode[84]. Die Reaktionsführung lehnt sich eng an die Peptid-Synthese nach der "Liquid-Phase"-Methode an[85]. Aus der NBOC-Aminosäure und Dicyclohexylcarbodiimid erhält man zunächst das symmetrische Anhydrid der geschützten Aminosäure. Die so voraktivierte Komponente wird mit einer konzentrierten Lösung von Aminodextran in Dimethylsufoxid in Gegenwart von N-Methylmorpholin umgesetzt.



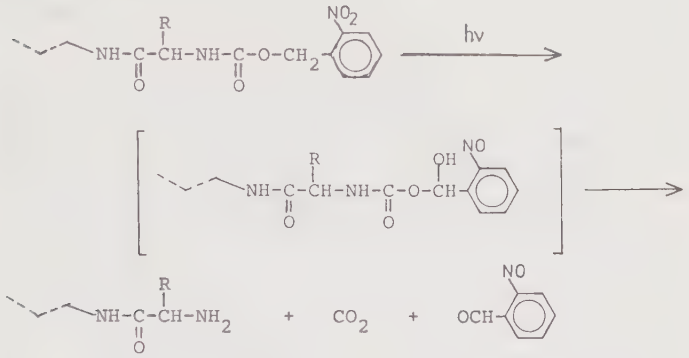
Die Kupplungsreaktion verläuft bei Raumtemperatur sehr langsam. Bei 35°C und 40 Stunden Reaktionsdauer wird ein Maximum an Belegung der Dextran-Aminogruppen mit Aminosäureresten erreicht. Der Belegungsgrad kann aus der Aminosäurenanalyse des Produktes bestimmt werden. Er beträgt unter den oben genannten Bedingungen für NBOC-Glycin 85 %, für Di-NBOC-Histidin 78 % bezogen auf die primären Dextran-Aminogruppen. Die Belegung kann auch aus der Elementaranalyse berechnet werden. Danach ergibt sich für die Kupplung von NBOC-Gly 84 %ige Belegung, für Di-NBOC-His 80 %. Trotz des geringen Stickstoffgehalts und des relativ

großen absoluten Fehlers der Elementaranalyse, können die Belegungszahlen aus der Aminosäureanalyse damit gut bestätigt werden.
Bei den ^{1}H-NMR-Spektren der dextrangekuppelten geschützten Aminosäuren kann durch Spektrenakkumulation das Signal-Rauschverhältnis soweit verbessert werden, daß die Resonanzsignale der Schutzgruppen beobachtet werden können.
Die IR-Spektren weisen keine Dextran-Ester-Carbonyl-Absorptionen bei 1750 bis 1735 cm^{-1} auf. Veresterung der Hydroxylgruppen des Dextrans wird unter diesen Reaktionsbedingungen nicht beobachtet.

Die NBOC-Schutzgruppe kann leicht mit Licht größerer Wellenlänge als 320 nm abgespalten werden. Durch die Vermeidung kurzwelliger Strahlung ist nur die Schutzgruppe zur Absorption fähig.



Der Mechanismus der Reaktion ist bekannt[86]. Unter Lichteinwirkung findet im ersten Reaktionsschritt ein intramolekularer Sauerstofftransfer von der Nitrogruppe zur Benzylgruppe statt. Die gebildete o-Nitrosobenzylalkoholgruppierung ist instabil. Sie stabilisiert sich unter Spaltung des Moleküls zu o-Nitrosobenzylaldehyd. Dabei werden die bislang geschützte Aminogruppe und Kohlendioxid freigesetzt.



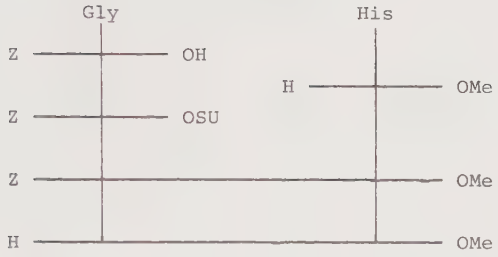
Der Einsatz von Abfangreagenzien für o-Nitrosobenzaldehyd wurde getestet. Diese sollten die Bildung von Azomethinen aus o-Nitrosobenzaldehyd und der freigesetzten Aminosäure verhindern. Abspaltungsreaktionen unter Zusatz von Hydrazin oder Phenylhydrazin ergaben Proben mit erhöhtem Stickstoffgehalt. Dies kann nur auf äußerst unerwünschte aminolytische Nebenreaktionen zurückgeführt werden. Der Einsatz von Abfangreagenzien ist überdies überflüssig, denn die Abspaltungsreaktion verläuft quantitativ und in den IR-Spektren der Produkte werden keine Nitrosobanden beobachtet. Unter den Bedingungen der Photoabspaltung tritt wahrscheinlich die Reaktion des o-Nitrosobenzaldehys mit sich selbst in den Vordergrund. Es bildet sich die Azobenzol-2,2'-dicarbonsäure[86].

Anhand der IR-Spektren kann der Fortgang der Abspaltung der Schutzgruppe verfolgt werden. In den IR-Spektren der geschützten Verbindungen tritt bei 1535 cm^{-1} eine Absorption auf, die durch die asymmetrische N-O Valenzschwingung der Nitrogruppe am aromatischen Ring hervorgerufen wird. Das Verschwinden dieser Bande zeigt die Beendigung der Abspaltungsreaktion an. Versuchsreihen in Dimethylsulfoxid/Wasser-Gemischen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen zeigen, daß die photolytische Spaltung sehr schnell erfolgt. In reinem Dimethylsulfoxid ist sie bereits nach 10 Minuten beendet. Durch Aminosäureanalysen konnten in den Produkten Glycin und Histidin zu 100 % bzw. 87 % wiedergefunden werden. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt der Aminosäuregehalt ab. Nach 3 Stunden Bestrahlung beträgt der Glycingehalt der entsprechenden Verbindung nur noch 52 %. Sowohl die Schutzgruppenabspaltung als auch die Aminosäurenabnahme verlaufen in Dimethylsulfoxid/Wasser-Gemischen noch schneller. Analoge Ergebnisse erhält man auch aus den UV-Auswertungen der Dinitrophenyl-Derivate. Reines Dimethylsulfoxid ist daher das Lösungsmittel, in dem die Photolyse mit der größten Selektivität durchgeführt werden kann.

Nach Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppen steht der Spacer des funktionalisierten Polymers um eine Aminosäure verlängert für weitere Additionen zur Verfügung.

4.1.2. Der proximale Ligand

Als Ligand, der die Koordination des proximalen Histidins F 8 am Eisenzentralatom imitieren soll, wird das Dipeptid Glycin-Histidin-Methylester verwendet. Die Synthese erfolgt über den Aktivester aus N-Hydroxysuccinimid (HOSU) und Benzyloxycarbonylglycin (Z-Gly-OH):



Der Hinweis auf diese Kupplungsmethode stammt aus einer Arbeit über die Synthese eines Pentapeptidfragments aus der α-Kette des Hämoglobins im Helix-Bereich des distalen Histidins[87]. Der N-Hydroxysuccinimidester Z-Gly-OSU wird mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagens in Dioxan hergestellt[88]. Histidinmethylester mit freier α-Aminogruppe wird aus seinem Dihydrochlorid nach Hillmann[89] mit ammoniakgesättigtem Chloroform freigesetzt. Setzt man diese beiden Komponenten in einem optimierten Mol-Verhältnis von 1:2.4 in Dioxan miteinander um, so erhält man das vollgeschützte Dipeptid Z-Gly-His-OMe ohne Nebenprodukte mit 93 %iger Ausbeute bezogen auf Z-Gly-OSU.

Als Alternative wurde die Darstellung des Dipeptids mit Hilfe der Azidmethode getestet. Experimentelle Details hierfür konnten einer Arbeit über die Synthese von geschützten Myoglobin-Peptid-Sequenzen des F-Helix-Bereiches entnommen werden[90]. Diese Kupplungsmethode erwies sich jedoch als wesentlich weniger selektiv. Es entstand ein Produktgemisch aus 6 Komponenten, das nur unvollständig getrennt werden konnte.

Das reine vollgeschützte Dipeptid wird aus der OSU-Kupplung amorph erhalten. Seine Identität kann durch Felddesorptions-Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Für Z-Gly-OSU er-

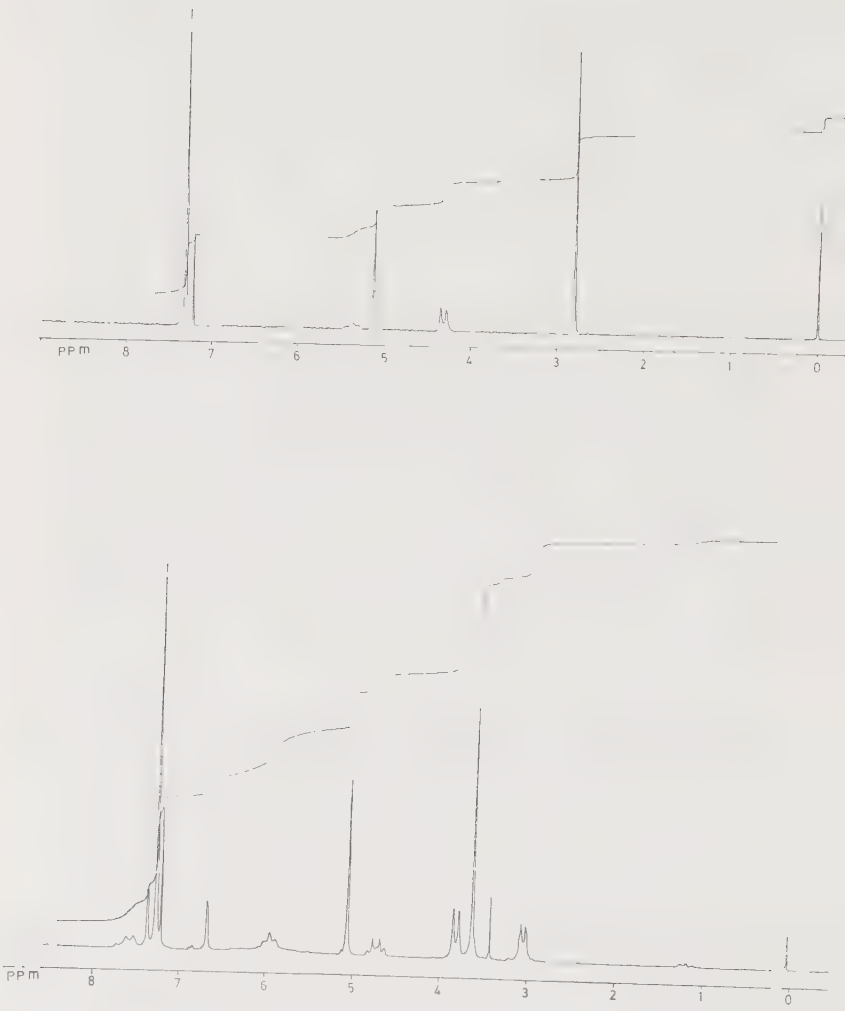
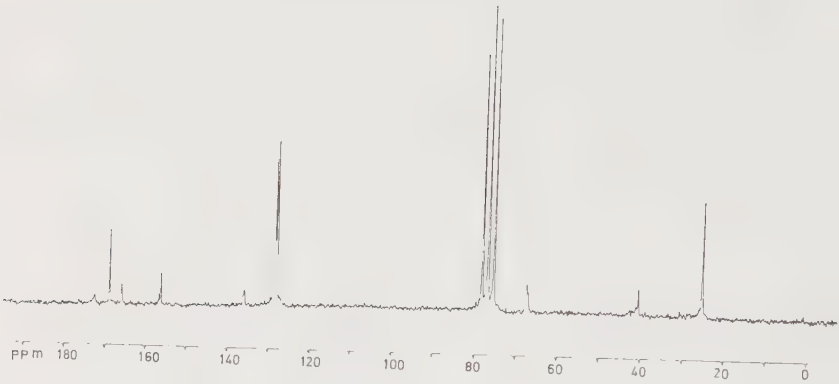


Abb. 21: ^{1}H-NMR-Spektren von Z-Gly-OSU (oben) und Z-Gly-His-OMe in $CDCl_3$

Tab. 1: Zuordnung der ^{1}H-NMR-Spektren ($CDCl_3$)

Z-Gly-OSU			Z-Gly-His-OMe		
δ[ppm]	Multiplizität	Zu-ordnung	δ[ppm]	Multiplizität	Zu-ordnung
2.81	Singulett	17			
			3.03 3.09	Dublett	12
			3.64	Singulett	11
4.29 4.36	Dublett	7	3.86 3.80	Dublett	7
			4.64 4.84	Multiplett	9
5.14	Singulett	5	5.07	Singulett	5
5.38	verbreitert	NH(Gly)	5.96	Triplett (verbreitert)	NH(Gly)
			6.70	Singulett	14
7.34	Singulett	1-4	7.30	Singulett	1-4
			7.38 7.39	Dublett	15
			7.54 7.61	Dublett	NH(His)



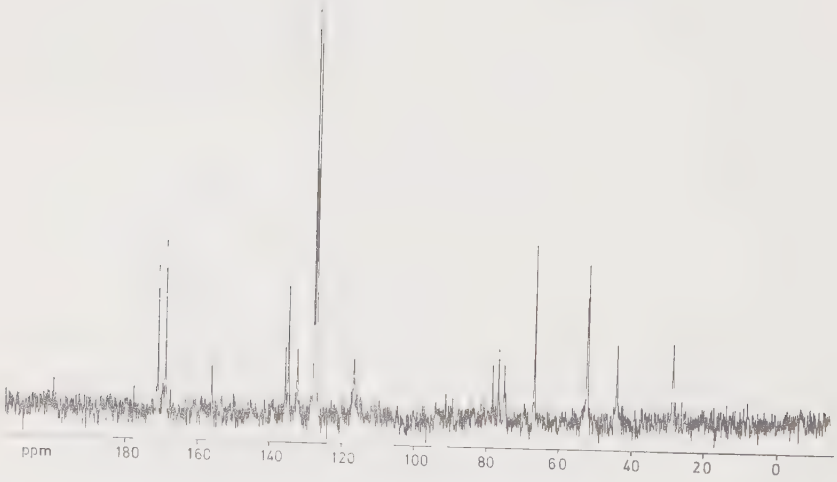


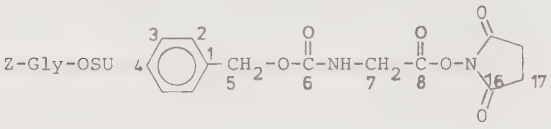
Abb. 22: ^{13}C-NMR-Spektren von Z-Gly-OSU (oben) und Z-Gly-His-OMe in $CDCl_3$

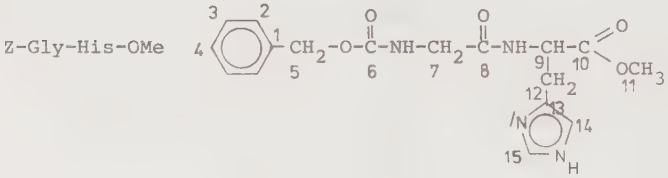
Tab. 2: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Spektren

Z-Gly-OSU		Z-Gly-His-OMe		His
δ[ppm]	Zu-ordnung[a)]	δ[ppm]	Zu-ordnung[a)]	δ[ppm] b)
25.45	17			
		28.81	12	27.5
40.59	7	44.29	7	
		52.21	11	
		52.59	9	54.5
67.46	5	66.87	5	
		117.05	14	120.8
128.15	3	127.81	3	
		128.03	13	128.8
128.51	2	128.43	2	
		132.81	4	
135.87	1	135.32	1	
136.08	4			
		136.17	15	136.8
156.23	6	156.88	6	
166.00	8	169.57	8	
168.91	16			
		171.67	10	172.7

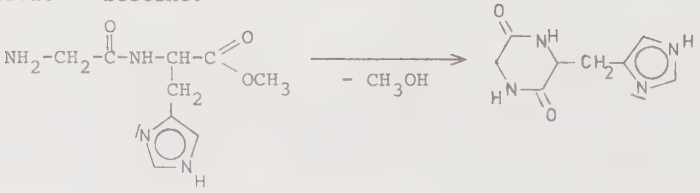
a) in $CDCl_3$; b) D_2O, pH 6.3[140)]

hält man das Molekülionensignal $M^{\oplus}$ m/z 306, für Z-Gly-His-OMe das $(M+1)^{\oplus}$-Signal m/z 361 sowie die Signale m/z 722 und m/z 1083, die auf die Clusterionenbildungen $2(M+1)^{\oplus}$ und $3(M+1)^{\oplus}$ zurückzuführen sind.
Beide Verbindungen können durch Zuordnung ihrer ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Signale charakterisiert werden.





Die Bindung des Liganden an das Porphyringerüst erfolgt über die Aminofunktion des Glycins. Die Z-Schutzgruppe wird durch katalytische Hydrierung mit Palladium/Kohlenstoff in absolutem Methanol abgespalten. Der Fortgang der Abspaltung wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert, da bei zu langer Reaktionszeit die Gefahr der Cyclisierung des Glycin-Histidin-Methylesters zum Dioxopiperazinderivat[91] besteht.



Durch Essigsäurezusatz kann der Dipeptidmethylester als Acetat isoliert werden. Zur Kupplung an das Porphyrin muß H-Gly-His-OMe nicht isoliert werden. Nach Entfernen des Katalysators ist lediglich ein Lösungsmittelwechsel von Methanol zu Dimethylfomamid oder Dimethylsulfoxid notwendig.

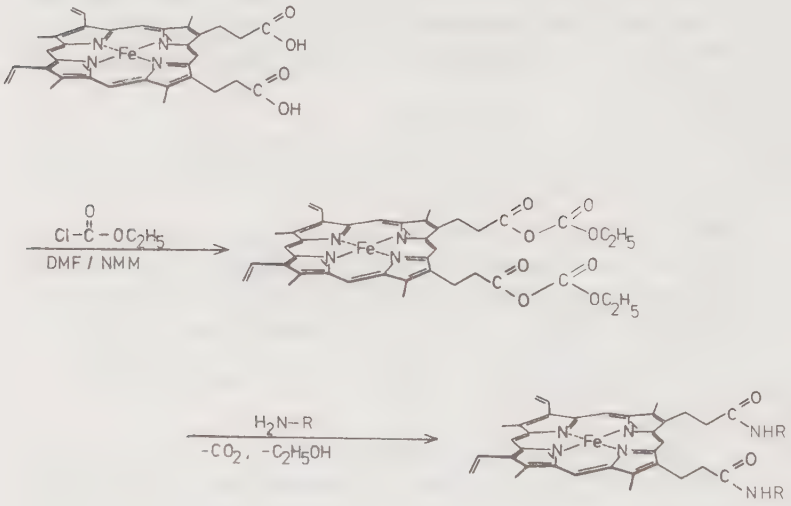
4.1.3. Kupplung der Dextran-Hämopolymere

Der polymere Träger und die proximale Komponente werden kovalent an die aktivierten Propionsäuregruppen von Hämin gebunden. Aus Häminestersynthesen und Protohämin-Peptid-Kupplungen sind mehrere Aktivierungsmethoden bekannt:

- die Carbodiimid-Methode mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)[59,92]
- die Carbodiimid-Aktivester-Methode mit DCCI und den intermediär gebildeten Aktivestern aus 1-Hydroxybenzotriazol[53], N-Hydroxysuccinimid oder Pentafluorphenol[93]
- die Imidazolid-Methode mit Thionyldiimidazol in Tetrahydrofuran[94]
- die Aktivestermethode über die Pentachlorphenylester[58]
- die Methode der gemischten Anhydride mit Pivaloylchlorid[95] oder Chlorameisensäureethylester[96,97]

Die letztgenannte Methode hat eine Reihe von Vorteilen bei der Aktivierung von Hämin. Die Reaktion der Propionsäuregruppen mit Chlorameisensäureethylester in Dimethylformamid bei Zusatz von N-Methylmorpholin verläuft schnell und quantitativ. Die Vinyl-Gruppen des Hämins werden nicht angegriffen, ein Verlust des Eisenions wird nicht beobachtet. Das Propionsäure-Kohlensäureethylester-Anhydrid reagiert leicht mit Komponenten, die freie primäre Amino-

gruppen enthalten. Bei der Aminolyse werden CO_2 und Ethanol abgespalten.



Die Reaktion kann dünnschichtchromatographisch gut verfolgt werden. Durch Variation des molaren Verhältnisses Hämin zu Chlorameisensäureethylester kann die bevorzugte Bildung der mono- bzw. di-aktivierten Derivate gesteuert werden. Nach der Umsetzung zu den Häminpeptiden werden die Produkte durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder "reversed-phase"-Material getrennt.

Die Kupplung der Dextran-Hämopolymere erfolgt als Konkurrenzreaktion der Polymerkomponente und des Dipeptids Glycin-Histidin-Methylester mit den aktivierten Propionsäuregruppen des Hämins. Pro Mol Hämin werden je 2 Mol N-Methylmorpholin und Chlorameisensäureethylester eingesetzt. Dem Dünnschichtchromatogramm kann entnommen werden,

daß Hämin vollständig abreagiert. Es bildet sich überwiegend das doppelt-aktivierte Hämin neben wenig monoaktiviertem. Die Zugabe eines Überschusses Chlorameisensäureethylester zur vollständigen Aktivierung beider Propionsäuregruppen muß wegen der Gefahr von Nebenreaktionen mit dem später zugesetzten Polymer unterbleiben.
Die Polymerkomponente wird in Dimethylsulfoxid gelöst. Der Zusatz von N-Methylmorpholin im Überschuß gewährleistet das Vorliegen freier, kupplungsfähiger, primärer Aminogruppen. Zu dieser Lösung wird das aktivierte Hämin in Dimethylformamid getropft, anschließend das Dipeptid H-Gly-His-OMe. Jede Abweichung von diesem Schema führt zum Ausfallen der Dextrankomponente oder zu einer Benachteiligung der Bildung des erwünschten gemischten Produktes. Die Reaktionslösung wird 70 Stunden unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur sehr vorsichtig gerührt. Die dextrangekuppelten Produkte Dextran-NH-R-Hämin-Gly-His-OMe und Dextran-NH-R-Hämin-R-NH-Dextran werden durch Eintropfen der Lösung in Methylethylketon ausgefällt. Mitgefälltes Hämin(mono)- und (bis)-Gly-His-OMe wird durch Umfällen aus Dimethylsulfoxid/Methylethylketon und Dimethylsulfoxid/Diethylether aus den Hämopolymeren entfernt. Die anschließende gelchromatographische Reinigung an Sephadex G 75 ergibt, daß sich wohl aus sterischen Gründen nur eine kaum nachweisbare Menge an doppelt-dextranverknüpftem Produkt gebildet hat. Das theoretisch mögliche mono-Additionsprodukt Dextran-NH-R-Hämin, das sich durch das Auftreten von UV-VIS-Mischspektren manifestrieren müßte, konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Zuordnung der Spots beim Chromatogramm der Hämin-Aktivierung, zunächst vorgenommen auf Grund von Polaritätsüberlegungen, konnte durch die gezielten Synthesen von Hämin(mono)-Glycin-Histidin-Methylester und Hämin(bis)-Glycin-Histidin-Methylester bestätigt werden. Die Trennung

und Charakterisierung der Reaktionsprodukte durch Massenspektrometrie wird in Kapitel 5.1. beschrieben.

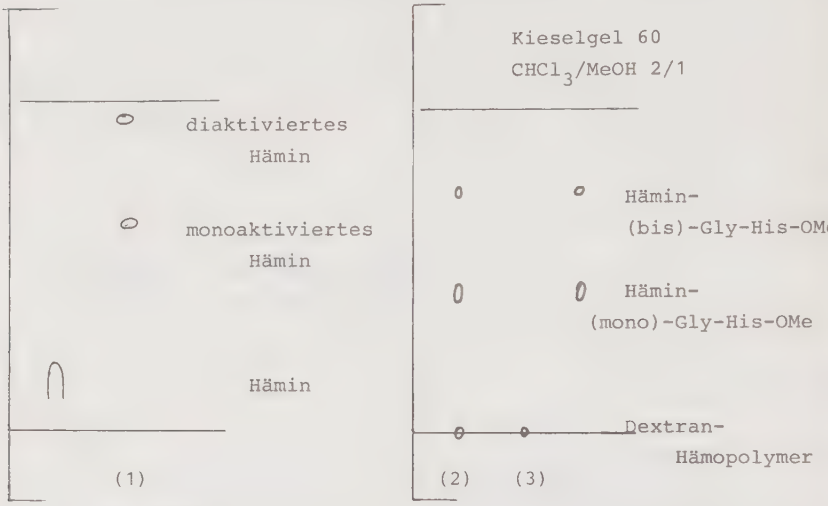


Abb. 23: Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle bei der Aktivierung des Hämins (1), Kupplung (2) und Isolierung (3) der Dextran-Hämopolymere

Nach der beschriebenen Methode wurden drei Dextran-Hämopolymere synthetisiert:

I Dextran-NH-His-Hämin-Gly-His-OMe

II Dextran-NH-Gly-His-Hämin-Gly-His-OMe

III Dextran-NH-Gly-Hämin-Gly-His-OMe

Unterschiedliche "Konzentrationen" an freien Aminogruppen am Spacer-Ende des funktionalisierten Polymers führen zu unterschiedlich dichten Belegungen mit Hämin-Zentren.

Im Hämopolymer I trägt der Sapcer 8.8 Histidin-Reste pro Molekül Dextran-NH-His. Die photolytische Schutzgruppenabspaltung ist bei den histidinhaltigen Polymerkomponenten wesentlich schwieriger zu steuern, als bei den glycinhaltigen. Während im Hämopolymer III 11 freie Glycin-Aminogruppen mit dem Porphyrin gekuppelt werden, enthält das Hämopolymer II nur 3.5 Histidin-α-Aminogruppen. Die doppelte Schutzgruppenabspaltung beim Aufbau des Spacers im Dextran-NH-Gly-His führt zu diesem starken Verlust gegenüber Dextran-NH-Gly, wobei das gleiche Aminodextran-Grundpolymer verwendet wurde. Durch Dinitrophenyl-Derivatisierungen konnte nachgewiesen werden, daß dieser Verlust an Histidin-Bindungsstellen auf die Abspaltung der gesamten Spacerkette vom Polymer bei der Schutzgruppenabspaltung zurückzuführen ist. Die polymere Komponente enthält also keine unterschiedlichen primären Aminogruppen, was zu unterschiedlich koordinierten Eisenionen in dem Hämopolymer führen würde.

4.2. Oxygenierungsuntersuchungen an Dextran-Hämopolymeren

Nach der Synthese liegt das Eisenzentralion der Hämopolymere in der oxidierten Form (Fe III) vor. Die Reduktion zu Eisen-II wird in wässrigem Medium (Phosphatpuffer pH 7.45 oder bidestilliertes Wasser) mit Natriumdithionit durchgeführt. In Dimethylsulfoxid wird zur Reduktion ein Natriumdithionit-Kronenetherkomplex eingesetzt[98]. Ein Überschuß an Reduktionsmittel muß vor allem in wässriger Lösung vermieden werden, da Dithionit und sein Kronenetherkomplex in Wasser bzw. protischen Lösungsmitteln schnell mit Sauerstoff reagieren und damit die Untersuchung der Hämopolymer-Sauerstoff-Komplexe stören:

$$Na_2S_2O_4 + O_2 + H_2O \longrightarrow NaHSO_4 + NaHSO_3$$

Die Reaktion des Dithionit-Kronenetherkomplexes mit Sauerstoff verläuft dagegen im aprotisch dipolaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid auch bei Raumtemperatur sehr langsam. Die Geschwindigkeit der Reduktion des Porphyrin-Eisenions dagegen ist vom Lösungsmittel unabhängig. Sie verläuft auch in Dimethylsulfoxid sehr schnell.

4.2.1. Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe und Dextran-NH-Gly-His-Häm-Gly-His-OMe

Im Hämopolymer I Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe (Abb. 24) sind alle wesentlichen Strukturelemente des Aktivzentrums von Hämoglobin und Myoglobin imitiert.

Die fünfte Koordinationsstelle des Eisens wird vom ε-Imidazol-Stickstoff des Glycin-Histidin-Methylesters eingenommen. Die Kettenlänge zwischen Imidazolring und Porphyringerüst ist so gewählt, daß trotz der kovalenten Bindung des Liganden an die Propionsäuregruppe eine optimale Koordination garantiert ist, dem proximalen Histidin im natürlichen Vorbild entsprechend. Die zweite Propionsäuregruppe des Hämins ist direkt mit dem Histidin des funktionalisierten Polymers verknüpft. Durch diese Anordnung ist eine koordinative Fixierung des Imidazolstickstoffs stark behindert, wiederum in Analogie zu den Bindungsverhältnissen auf der distalen Seite des Myoglobins. Das Histidin E 7 im Myoglobin ist zu weit vom Eisen-Zentralatom entfernt um koordinieren zu können. Das entsprechende Histidin des Hämopolymers ist ohne Zwischenglied direkt an das Porphyrin gebunden. Die Koordination am Eisen führt zu einer starken Spannung dieses Molekülteils. Auch Liganden, die normalerweise schwächer koordinieren als Imidazol sind daher in der Lage, das Histidin von der sechsten Koordinationsstelle am Eisen

zu verdrängen. Durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem verdrängten Histidin und dem koordinierten Sauerstoff wird der Sauerstoffkomplex des Hämopolymers stabilisiert.

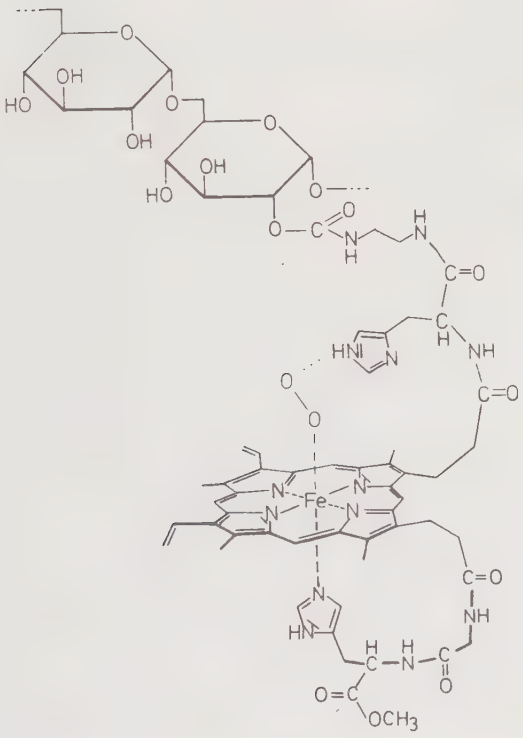
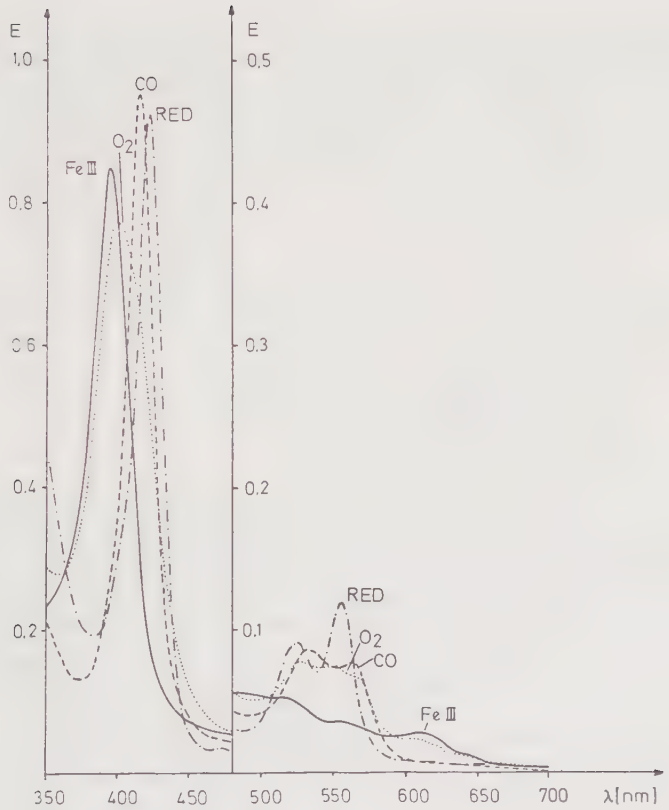


Abb. 24: Das Hämopolymer Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe

Das Hämopolymer I ist im aprotisch dipolaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid reversibel oxygenierbar. Das Aktivzentrum ist durch die Polymerkomponente abgeschirmt, die bimolekulare Autoxidationsreaktion ist dadurch blockiert. In Abbildung 25 sind die UV-VIS-Spektren eines Oxygenierungszyklus zusammengefaßt.
Die Reduktion zum Eisen-II-Hämopolymer erfolgt in einer Schutzgasküvette unter Argon. Die Form des Spektrums im sichtbaren Bereich weist auf eine sechsfache Koordination des Eisenzentralatoms hin.
Durch Zugabe von Kohlenmonoxid erfolgt sofortige, vollständige CO-Koordination. Die Bildung des CO-Komplexes ist reversibel. Das Hämopolymer kann durch mehrfaches Einfrieren unter Hochvakuum und Auftauen unter Argonatmosphäre quantitativ wieder in den reduzierten Zustand überführt werden. Die Abgabe des Kohlenmonoxids wird dabei durch den Phasenübergang des Systems erleichtert.
Sauerstoff-Zugabe führt zum Sauerstoff-Komplex, der wiederum reversibel in den reduzierten Zustand überführt werden kann durch das Einleiten von Argon in die Hämopolymer-Lösung. Der Übergang vom Sauerstoffkomplex zur reduzierten Form ist nicht völlig quantitativ. Ein Teil des aktiven Eisen-II-Hämopolymers geht durch eine langsame irreversible Oxidationsreaktion zur inaktiven Eisen-III-Verbindung verloren (Abb. 26). Durch erneute CO-Komplexierung kann das Ausmaß dieses Verlustes aus der Extinktionsabnahme bestimmt und die Halbwertszeit des Sauerstoffkomplexes errechnet werden. Sie beträgt für das Hämopolymer I in Dimethylsulfoxid bei 23°C 35 Minuten (Abb. 27).



	Soret-Bande [nm]	β-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	403		
reduzierte Form (RED)	423	524	556
CO-Komplex (CO)	416	534	566
oxygenierte Form (O_2)	409	529	551

Abb. 25: UV-VIS-Spektren des Hämopolymers Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe in Dimethylsulfoxid bei 23°C

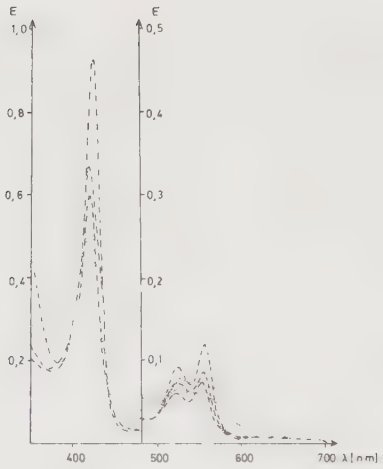
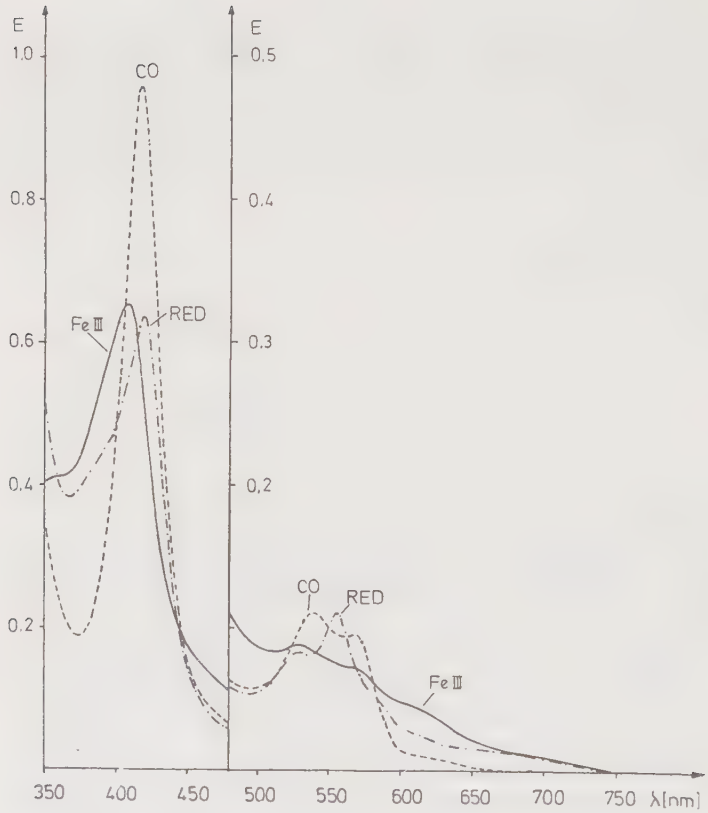


Abb. 26: UV-VIS-Spektren des oxygenierten Hämopolymers I aus 2 Oxygenierungszyklen

Abb. 27: UV-VIS-Spektren der CO-Komplexe des Hämopolymers I aus 2 Oxygenierungszyklen

Der allmähliche Verlust an reduzierten Aktivzentren im Hämopolymer muß auf die Reaktion des Reduktionsmittels Dithionit-Kronenether mit Sauerstoff zurückgeführt werden. Diese Reaktion läuft in Dimethylsulfoxid zwar nur langsam ab, es entstehen dabei aber das Hyperoxid- und das Peroxid-Anion, die für die Oxidation der Aktivzentren verantwortlich sind.

Alle synthetisierten Dextran-Hämopolymere sind gut wasserlöslich. Bei der Oxygenierungsuntersuchung des Hämopolymers I in Wasser kann man den Kohlenmonoxid-Komplex erhalten, ein stabiler Oxokomplex jedoch kann bei Raumtemperatur nicht beobachtet werden (Abb. 28). Die Zugabe von Sauerstoff zur reduzierten Spezies führt zu sofortiger irreversibler Oxidation des Aktivzentrums. Die bimolekulare Autoxidation ist durch die Einbettung im Polymerknäuel nach wie vor verhindert, jedoch tritt in wässriger Lösung die protonenkatalysierte Oxidation in den Vordergrund. Bedingt durch die große Anzahl von Hydroxylgruppen im Polymer kann in wässriger Lösung eine Protonenübertragung auf den koordinierten Sauerstoff erfolgen, wodurch dessen Oxidationspotential erhöht wird. Der entscheidende Reaktionsschritt, der zum irreversibel oxidierten Eisen-III-Porphyrin führt, ist jedoch erst die Dissoziation des Hyperoxid-Radikals (vgl. Kapitel 3.2.). Durch eine hydrophobe Umgebung des Aktivzentrums kann dieser Schritt und damit die protonenkatalysierte Oxidation unterbunden werden. Im Hämopolymer I ist die Abschirmung der distalen Seite des Porphyrins für protisches Milieu nicht genügend hydrophob.



	Soret-Bande [nm]	β-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	411		
reduzierte Form (RED)	424	531	558
CO-Komplex (CO)	420	540	570

Abb. 28: UV-VIS-Spektren des Hämopolymers Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe in Phosphat-Puffer pH 7.45 bei 23°C

Das Hämopolymer II Dextran-NH-Gly-His-Häm-Gly-His-OMe enthält gegenüber dem Hämopolymer I eine um Glycin verlängerte Aminosäurenbrücke zwischen Polymerspacer und Porphyrin.

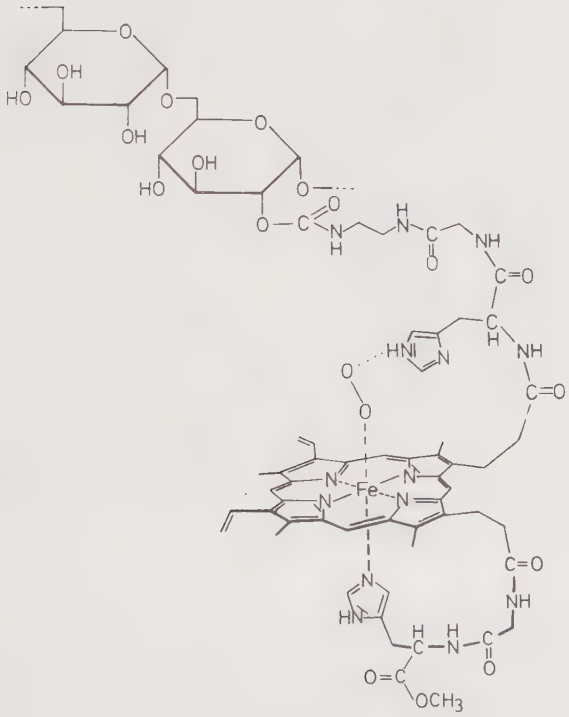


Abb. 29: Das Hämopolymer Dextran-NH-Gly-His-Häm-Gly-His-OMe

Das Oxygenierungsverhalten des Hämopolymers II entspricht völlig dem des Hämopolymers I. Die UV-VIS-Spektren sind identisch. Die verlängerte Spacerkette zum Polymer wirkt sich weder auf die Einbettung des Porphyrinsystems im Polymerknäuel noch auf die hydrophobe Abschirmung der sechsten Koordinationsstelle des Eisen-II-Ions aus. Die Halbwertszeit des Oxokomplexes in Dimethylsulfoxid stimmt im Rahmen der Meßgenauigkeit mit der des Oxy-Hämopolymers I überein. Die bimolekulare Autoxidation ist verhindert, die protonenkatalysierte Oxidation in wässrigem Medium nicht.
Die Polymerkomponente des Hämopolymers II weist eine wesentlich geringere Histidinbelegung auf verglichen mit dem Hämopolymer I. Dies hat eine um den Faktor 2.5 höhere Konzentration an Porphyrin-Aktivzentren im Hämopolymer I zur Folge. Wechselwirkungen zwischen den Aktivzentren wurden jedoch in keinem der synthetisierten Hämopolymere beobachtet. Die sehr aufwendige Synthese der Polymerkomponente Dextran-NH-Gly-His mit der schwer zu steuernden zweiten photolytischen Schutzgruppenabspaltung bringt also keinerlei Vorteile für das Konzept der Dextran-Hämopolymere. Sie hat im Gegenteil den Nachteil eines starken Verlustes von Funktionalität am Polymer.

4.2.2. Dextran-NH-Gly-Häm-Gly-His-OMe

Das Hämopolymer III hat gegenüber den Hämopolymeren I und II eine veränderte Stereochemie am Aktivzentrum, hervorgerufen durch den Ersatz des "distalen" Histidins durch Glycin. Die sechste Koordinationsstelle am Eisen ist nicht besetzt.

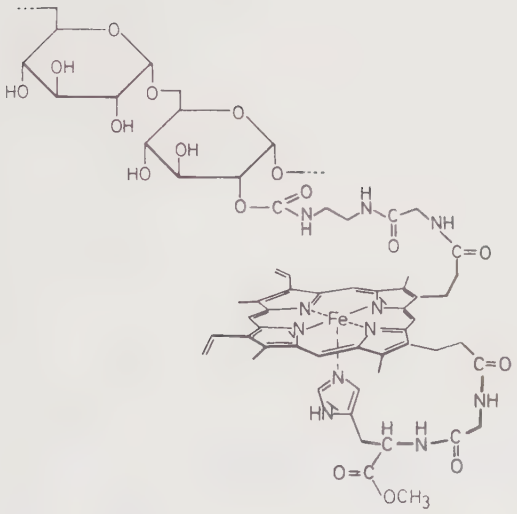


Abb. 30: Das Hämopolymer Dextran-NH-Gly-Häm-Gly-His-OMe

Die Elektronenspektren dieses Hämopolymers in Dimethylsulfoxid weisen eine weitgehende Analogie zu den Spektren der Cytochrom-Oxidase bzw. deren Untereinheiten auf. Die reduzierte Form und der Kohlenmonoxid-Komplex des Hämopolymers zeigen starke Absorptionen mit Maxima bei 613 bzw. 614 nm. Ein Sauerstoffkomplex konnte auch in Dimethylsulfoxid nicht beobachtet werden. In Tabelle 3 sind die Absorptionsmaxima der Elektronenspektren der Cytochrom-Oxidase, ihrer funktionellen Bestandteile und synthetisierten Modellverbindungen zusammengestellt.

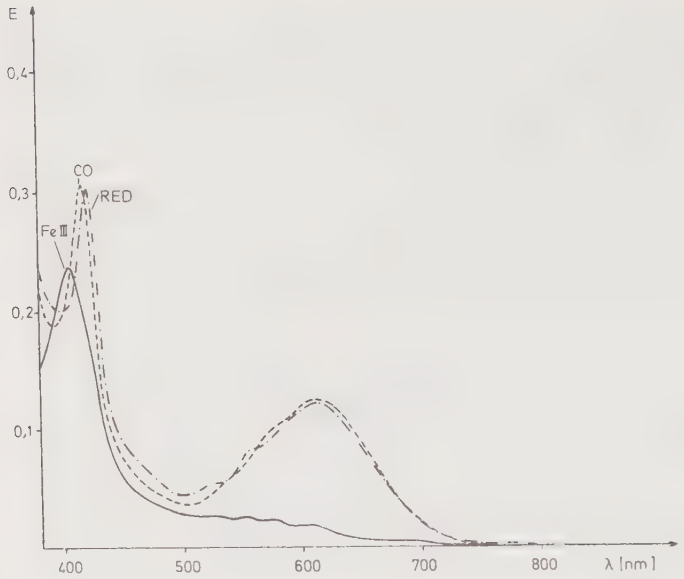


Abb. 31: UV-VIS-Spektren des Hämopolymers Dextran-NH-Gly-Häm-Gly-His-OMe in Dimethylsulfoxid bei 23°C

- - - - - reduzierte Form (RED)

--------- CO-Komplex (CO)

———— oxidierte Form (Eisen-III)

Die Eisenzentralatome sind in den funktionellen Untereinheiten der Cytochrom-Oxidase verschieden koordiniert. Das Häm a-Zentrum in Cytochrom a enthält ein sechsfach koordiniertes Eisenatom und ist wie Cytochrom c nicht zu einer Sauerstoff-Koordination in der Lage. Das sauerstoffbindende Zentrum des Enzymsystems ist das Häm a in Cytochrom a_3. Für dieses Aktivzentrum wird ein fünffach koordiniertes Eisenzentralatom diskutiert[99]. Die fünfte Koordinationsstelle nimmt ein Histidin ein. Die sechste

Tab. 3: Absorptionsmaxima der Elektronenspektren von Cytochrom Oxidase und synthetischer Modellverbindungen, Wellenlängenangaben in [nm]

	oxidierte Form		reduzierte Form		CO-Komplex		Referenz
	Soret-Bande	α-Bande	Soret-Bande	α-Bande	Soret-Bande	α-Bande	
Cytochrom-Oxidase[a]							
Untereinheit I	425	595	440	597	430	600	101
Untereinheit II-III	425	597	441	600	431	602	
Cytochrom-Oxidase	421	598	443	603	-	-	102
Cytochrom a	426	595	444	604	-	-	
Cytochrom a_3	414	600	442.5	602	-	-	
Cytochrom-Oxidase	423	599	444	605	431	590	103
Häm a-Poly-L-Lysin-Komplex[b]	402	-	428	574	424	584	104
Dextran-Hämopolymer[c]	404	-	421	613	416	614	

[a] Untereinheit I und II-III in Polyacrylamid-Gel bei 0°C; [b] bei pH 10.6

[c] Dextran-NH-Gly-Häm-Gly-His-OMe in Dimethylsulfoxid

Koordinationsstelle bleibt frei für die Sauerstoff-Koordination oder ist mit einem nur schwach koordinierten Schwefel-Liganden besetzt, der von Sauerstoff verdrängt werden kann[100].

Aus der Analogie der Spektren kann der Schluß gezogen werden, daß das Häm a-Aktivzentrum in Cytochrom a_3 durch das Hämopolymer III imitiert wird. Die gemessenen Spektren entsprechen jedoch nicht denen, die man für ein fünffach koordiniertes Eisen-Porphyrinsystem mit einem gut koordinierenden Histidin an der fünften Koordinationsstelle erwarten würde. Aus der Spektrenform und der Lage der Absorptionsmaxima muß auf die Beteiligung eines schwach koordinierenden Schwefel-Liganden an der sechsten Koordinationsstelle geschlossen werden. Diese Funktion übernimmt in den Hämopolymer-Lösungen ein Dimethylsulfoxid-Molekül. Das Sauerstoffbindungszentrum der Cytochrom-Oxidase kann also mit einer Modellverbindung annähernd beschrieben werden, ohne daß ein Kupferion beteiligt werden muß. Dies stützt die Annahme, daß das Kupferion in Cytochrom a_3 keinen Einfluß auf die primäre Sauerstoffanlagerung ausübt. Das Arbeitsmodell für Cytochrom-Oxidase kann in diesem Punkt bestätigt werden (vgl. Abb. 3 in Kapitel 1.1.1.). Das Kupferion dient erst im zweiten Reaktionsschritt der Sauerstoffreduktion als Elektronenlieferant. Dabei ist eine direkte Koordination des Sauerstoffs am Kupfer wahrscheinlich. Die genaue Lage der Kupferionen im Enzymkomplex ist jedoch noch nicht bekannt.

5. Proteingebundene Porphyrinderivate

Histidinhaltige Proteine wie das Plasmaprotein Albumin oder Gelatine sind in der Lage, Porphyrinsysteme zu solubilisieren. In wässriger Lösung ist die koordinative

Fixierung von Porphyrinderivaten an Albumin stark pH-abhängig. Im neutralen und alkalischen Bereich (pH > 6,8) verfügt Humanserumalbumin nur über eine Bindungsstelle für ein Porphyrin. Diese wird dem Tryptophan 213 zugeordnet, dem einzigen in der Aminosäuresequenz des Humanserumalbumins. In sauren Lösungen (pH < 6.5) dagegen findet man sieben und mehr Bindungsstellen für Porphyrine[105]. Für den Mechanismus der koordinativen Bindung werden im wesentlichen zwei Vorstellungen diskutiert. Die Annahme von nicht-kovalenten Bindungen zwischen Seitenketten des Porphyringerüsts und dem Albumin[106] ist dabei die ungewöhnlichere Vorstellung. Wahrscheinlicher ist die Erklärung der Porphyrinfixierung durch die Koordination von Aminosäure-Seitengruppen am Porphyrin-Metall[107]. Die pH-Abhängigkeit der Zahl der Bindungsstellen kann durch eine Konformationsänderung im Protein in schwach saurer Lösung erklärt werden. Die Anzahl der Bindungsstellen kann auch in gepufferter Lösung mit pH 7.4 auf etwa 10 erhöht werden, wenn Porphyrinsysteme mit Carboxylat-Gruppen in der Peripherie an Albumin gebunden werden[108]. Die Tertiärstruktur des Humanserumalbumins wird sowohl unter dem Einfluß der negativ geladenen Gruppen als auch durch die oben beschriebene pH-Änderung gelöst. Durch die Konformationsänderung des Proteins sind mehrere Aminosäurereste in der Lage, die axiale Ligandenposition am Metallion eines Porphyrinsystems einzunehmen. Die koordinierenden Aminosäuren sind mit großer Wahrscheinlichkeit Histidin-Reste, von denen 16 in der Sequenz des Humanalbumins vorkommen.

Es ist auch möglich, Häminderivate kovalent an Albumin zu binden. Die Kupplung kann über die Pentachlorphenylester der Porphyrine erfolgen, durch Aktivierung mit dem Woodward Reagens K oder nach der Carbodiimid-Aktivester-Methode mit N-Hydroxysuccinimid. Die Bindungsbildung erfolgt zwischen einem Propionsäurerest des Hämins und der ε-Aminogruppe

einer Lysin-Seitenkette des Albumins. Bis zu 9 Häminreste können so kovalent an Rinderserumalbumin gebunden und solubilisiert werden[109].

5.1. Synthese und Charakterisierung der prosthetischen Gruppe Häm(mono)-Gly-His-OMe

Um zu proteingebundenen Hämderivaten zu gelangen, die mit den Dextran-Hämopolymeren verglichen werden können, muß zunächst das Aktivzentrum Häm(mono)-Gly-His-OMe dargestellt werden, das inclusive der fünften Koordinationsstelle identisch mit den prosthetischen Gruppen der Hämopolymere I-III ist. Aus dem Vergleich der Elektronenspektren bei Oxygenierung und Kohlenmonoxid-Komplexbildung ist daher eine Aussage über die Verhältnisse an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens in koordinativ proteingebundenen Hämderivaten möglich.

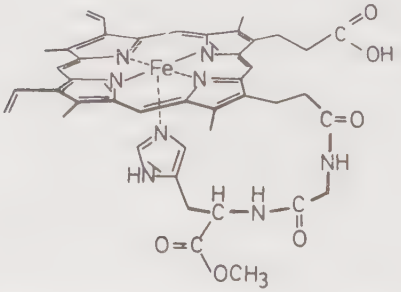


Abb. 32: Häm(mono)-Gly-His-OMe

Die Synthese erfolgt nach dem in Kapitel 4.1.3. beschriebenen Verfahren. Hämin wird in Dimethylformamid durch Chlor-

ameisensäureethylester aktiviert. Das gemischte Anhydrid wird mit dem Dipeptid Glycin-Histidin-Methylester umgesetzt. Zur Vermeidung von nicht umgesetztem Hämin genügt bei der Aktivierung schon ein sehr geringer Überschuß Chlorameisensäurethylester (Molverhältnis 1:1.05). Nach der Umsetzung mit dem freigesetzten Dipeptid zeigt das Dünnschichtchromatogramm 4 Spots.

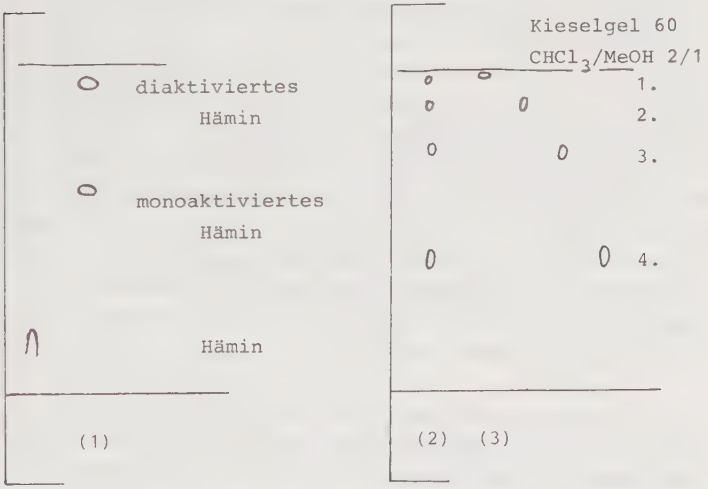


Abb. 33: Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Hämin-Aktivierung (1), der Kupplung (2) und der Trennung der Reaktionsprodukte (3) bei der Darstellung von Hämin(mono)-Gly-His-OMe

Die Isolierung der Reaktionsprodukte erfolgt durch Ausfällen in absolutem Diethylether. Die Trennung der Produkte gelingt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol 2:1. Bei der gezielten Synthese von Hämin(bis)-Gly-His-OMe (Molverhältnis

Hämin zu Chlorameisensäureethylester 1:2.1) erhält man die diaktivierte Komponente und deren Folgeprodukte in deutlichem Überschuß, sodaß auf diese Weise eine "chemische" Zuordnung der Reaktionsprodukte getroffen werden kann.

Die präzise Charakterisierung der Produkte gelingt mit Hilfe der Felddesorptions-Massenspektrometrie. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Massenspektren auch von schwerflüchtigen Verbindungen zu erhalten. Ein weiterer Vorteil ist die relativ schonende Ionisierung direkt aus der festen Phase der Emitteroberfläche. Die Felddesorptions-Massenspektren weisen meist nur wenige Signale auf, oft nur fragmentlos das Signal des Molekülions. Die dargestellten Eisen-III-Protoporphyrinderivate sind einfach positiv geladen, als Gegenion fungiert jeweils ein Chlorid-Anion. In den Felddesorptions-Massenspektren solcher organischer Salze treten nur die Kationensignale auf. Die Molmassen der Häminderivate müssen daher um die Masse des Chloridions vermindert werden.

Die erste Fraktion der säulenchromatographischen Trennung ist hellbraun gefärbt. Es handelt sich um eine sehr geringe Menge an nicht umgesetztem diaktiviertem Hämin. Die Verbindung ist nicht stabil. Sie zersetzt sich in fester Form innerhalb von Tagen, in Lösung innerhalb von Stunden zu Hämin und Häminmethyl- und ethylestern. Die Fraktion kann nur isoliert werden, wenn absolute Lösungsmittel verwendet werden.
Die zweite, braun gefärbte Fraktion fällt ebenfalls in sehr geringer Menge an. Es handelt sich um Hämin(-methylester) (-Gly-His-OMe). Im Felddesorptions-Massenspektrum (Abb. 34) erhält man das $M^{\oplus}$-Signal m/z 838. Die Substanz bildet sich aus dem diaktivierten Hämin durch Kupplung des Dipeptids an der ersten aktivierten Carboxylgruppe, während die zweite mit Methanol reagiert, das als Lösungs-

mittel der Schutzgruppenabspaltung mitgeschleppt wurde. Das freigesetzte Dipeptid wird wegen der Gefahr der intramolekularen Aminolyse nicht isoliert. Der Lösungsmittelwechsel durch Zugabe von Dimethylformamid und Abziehen des Methanols am Rotationsverdampfer gelingt also nicht völlig quantitativ. Die Menge des gebildeten Nebenproduktes ist jedoch sehr gering.
Die dritte Fraktion ist rot gefärbt, das FD-Massenspektrum (Abb. 35) zeigt den $(M+1)^{\oplus}$-Peak m/z 1033 für Hämin-(bis)-Gly-His-OMe und den $M^{2\oplus}$-Peak m/z 516.
Die braune, vierte Fraktion schließlich ist das gewünschte Hämin-(mono)-Gly-His-OMe. Das FD-Massenspektrum (Abb. 36) liefert den Molpeak $M^{\oplus}$ m/z 824. Bei langer Verweildauer

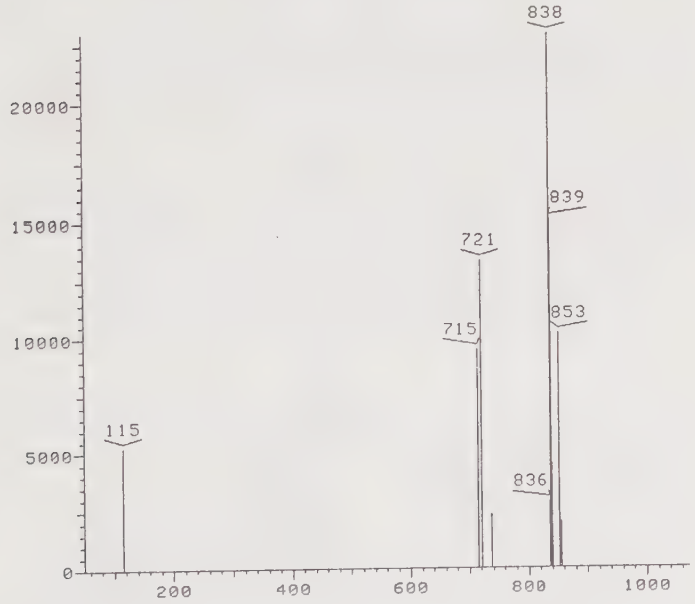


Abb. 34: Felddesorptions-Massenspektrum von Hämin(-methylester)(-Gly-His-OMe), Lösungsmittel Chloroform/Methanol 2:1

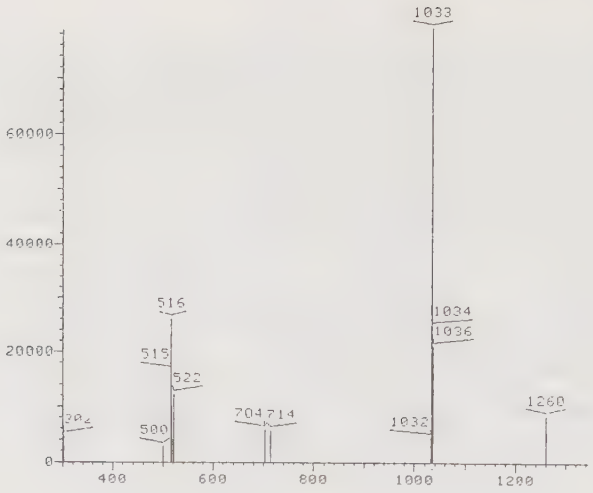


Abb. 35: FD-Massenspektrum von Hämin-(bis)-Gly-His-OMe, Lösungsmittel Chloroform/Methanol 2:1

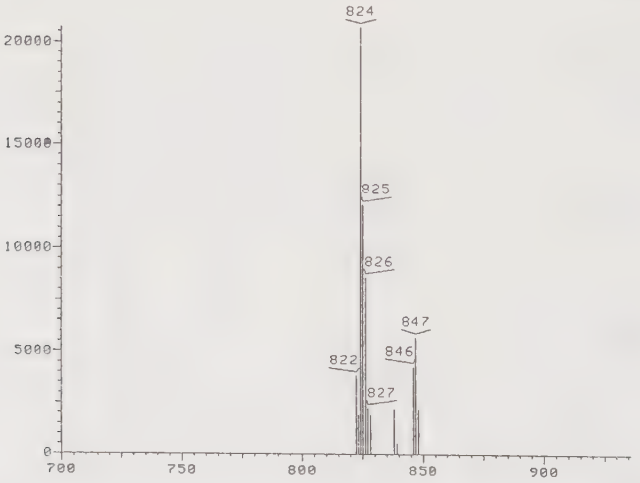
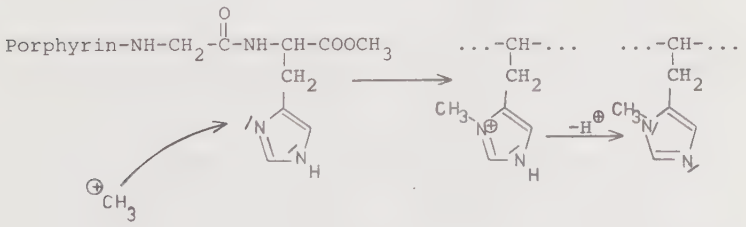


Abb. 36: FD-Massenspektrum von Hämin-(mono)-Gly-His-OMe, Lösungsmittel Chloroform/Methanol 2:1

oder bei Verwendung von wasserhaltigen Lösungsmitteln ist die Gefahr der Zersetzung der vierten Fraktion auf der Säule gegeben. Die Verweildauer kann erheblich verkürzt werden, wenn die Trennung auf der präparativen Niederdruck-Chromatographieanlage durchgeführt wird. Die Anlage arbeitet nach dem Prinzip der Flüssigchromatographie unter axialer Kompression der stationären Phase.
Die Reduktion von Hämin-(mono)-Gly-His-OMe zum Häm-Derivat wird nach erfolgter Koordination der Proteine mit Natriumdithionit durchgeführt.

Die Felddesorptions-Massenspektren der Hämin-Dipeptid-Derivate weisen einige Besonderheiten auf. In einer ganzen Reihe von Spektren sind die ungewöhnlichen Signale $(M+14)^{\oplus}$ und $(M+28)^{\oplus}$ zu finden. Das Auftreten von Ionen mit solchen Massen in den FD-Spektren wurde bereits bei Peptidderivaten[110] und auch bei Porphyrinmethylestern[111,112] beobachtet. Die Bildung dieser Ionen wird zurückgeführt auf intermolekulare thermische Transmethylierungsreaktionen[113]. Aus Methylestergruppierungen werden Methyl-Gruppen abgespalten, die auf die basischen Stickstoffatome von benachbarten Histidin- oder Porphyrinmolekülen übertragen werden können. Anschließende Protonenabspaltung führt zu den N-methylierten Produkten, die eine um 14 Einheiten höhere Masse als die ursprünglichen Moleküle aufweisen[114].



In den vorliegenden FD-Massenspektren der Hämin-(Gly-His-OMe)-Derivate kann das $(M+14)^{\oplus}$ Signal zum intensivsten Signal des Spektrums werden (Abb. 37), und selbst der $(M+28)^{\oplus}$ Peak kann höher als der Molpeak werden (Abb. 38).

Die ionische Desorption von organischen Salzen erfordert höhere Emitterheizströme bei der Felddesorptionstechnik. Natriumverunreinigungen des Emitters führen zur Anlagerung von Natriumionen und zum Auftreten des $(M+23)^{\oplus}$ Signals, z.B. in Abbildung 36. Bei höheren Emitterheizströmen treten unspezifische Fragmentionen auf, die durch den wenig charakteristischen termisch induzierten Abbau oder durch nichtspezifische Eliminierung kleiner, stabiler Moleküle hervorgerufen werden. Fluktuierende FD-Ionenströme, die auf Grund von thermisch-feldinduzierten Oberflächenprozessen bei höheren Heizströmen auftreten, verschlechtern die Reproduzierbarkeit der Spektren[115]. Charakteristische Fragmentionen treten daher in den FD-Massenspektren organischer Salze nur in Ausnahmefällen auf.

Mit der "Fast Atom Bombardment"-Technik (FAB) steht prinzipiell eine weitere Ionisierungsmethode für nicht-flüchtige Verbindungen zur Verfügung. Bei den Testsystemen Hämatoporphyrin und Tetraisopropylporphyrin in Glycerinmatrix können die $(M+1)^{\oplus}$ Signale erhalten werden (m/z 599 bzw. m/z 479). Von den Hämin-Dipeptid-Verbindungen werden jedoch in den Matrixsubstanzen Glycerin, Glycerin/Dimethylformamid, m-Nitrobenzylalkohol keine Massenspektren erhalten. Auch bei den Protoporphyrin-Methylimidazol-Derivaten (vgl. Kapitel 5.4.), die gut in den Matrixsubstanzen Glycerin und Triethanolamin löslich sind, erhält man keine Spektren. Unter den Bedingungen der FAB-Ionisierung spalten sich wahrscheinlich die Liganden vom Porphyrinring ab und werden ionisiert. Vom Rest-Porphyrin wird dann kein Signal erhalten.

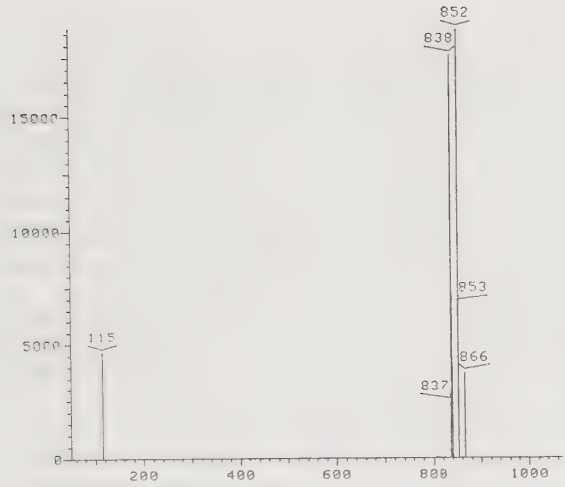


Abb. 37: FD-Massenspektrum von Hämin(-methylester)(-Gly-His-OMe) mit $(M+14)^{\oplus}$-Hauptsignal, Lösungsmittel Chloroform/Methanol 2:1

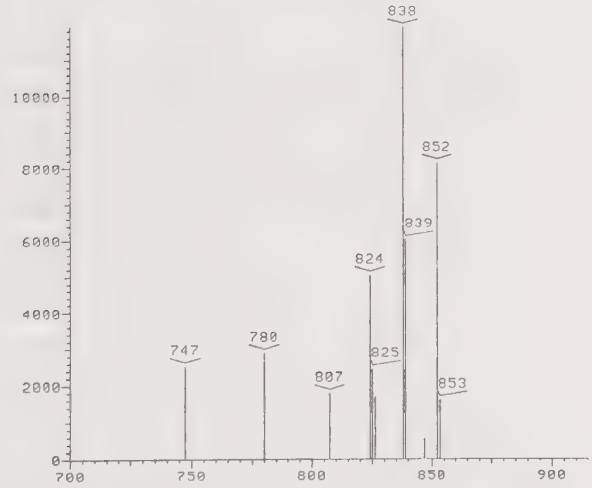


Abb. 38: FD-Massenspektrum von Hämin(-mono)-Gly-His-OMe mit intensiven $(M+14)^{\oplus}$- und $(M+28)^{\oplus}$-Signalen, Lösungsmittel Chloroform/Methanol 2:1

5.2. Albumingebundenes Häm(mono)-Gly-His-OMe; Kupplungsmethode und Oxygenierung

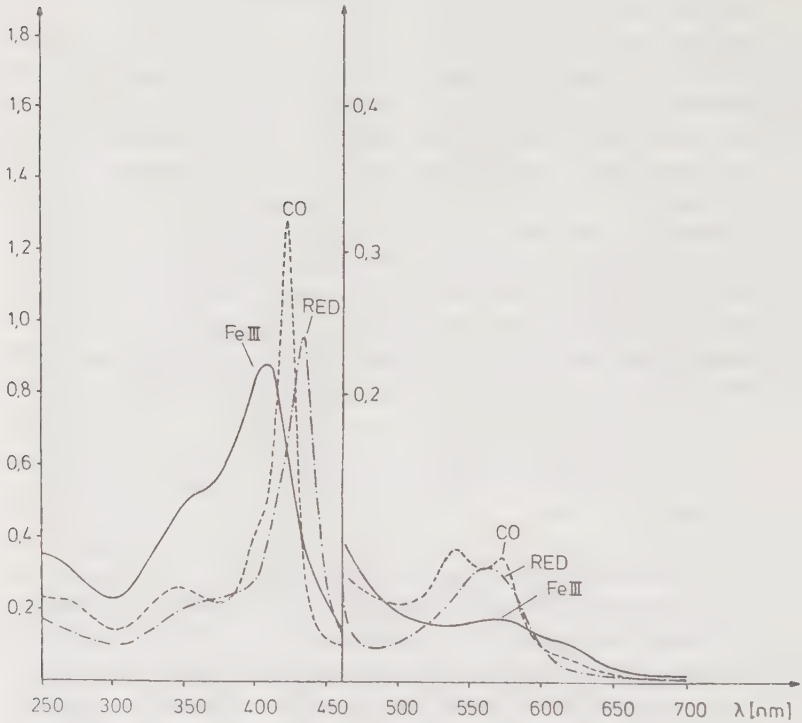
Das Blutplasma enthält ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen, die für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich sind und ein Eiweißreservoir des Organismus darstellen. Humanserumalbumin gehört mit einer Molmasse von 66 248 und einer Sequenz aus 584 Aminosäuren zu den kleinsten Plasmaproteinen[116]. Es ist jedoch die mengenmäßig größte Fraktion. Albumin ist in der Lage, eine Reihe von Stoffen reversibel zu binden und sie im Blut zu transportieren. Dazu gehören Fettsäuren und Bilirubin, aber auch Medikamente und toxische Stoffe. Durch die Bindung an Albumin wird die schnelle Ausscheidung von niedermolekularen Stoffen durch die Nieren verhindert. Auch die Globulin-Fraktionen enthalten Transportproteine, die meist größer und spezifischer als Albumin sind. Sie sind beispielsweise für den Transport von Hormonen verantwortlich.

Um Eisen-Porphyrinderivate an Albumin optimal koordinativ fixieren zu können, müssen beide Komponenten in homogener Lösung vorliegen. Die Umsetzung der beiden Lösungen muß unter definierten Bedingungen erfolgen, wobei die Gefahr der Denaturierung der Albuminkomponente berücksichtigt werden muß. Humanserumalbumin wird als 20 prozentige wässrige Lösung eingesetzt, die als Stabilisatoren ε-Aminocapronsäure und Acetyltryptophan enthält. Die Zusätze werden vor der Umsetzung mit den Porphyrinderivaten durch Ultrafiltration mit einer Polysulfon-Membran (Ausschlußgrenze 10 000) entfernt.
Hämin(mono)-Gly-His-OMe ist nicht wasserlöslich. Das einzige organische Lösungsmittel, in dem sich das Porphyrinderivat löst und dessen Zumischung zur wässrigen Albuminlösung nicht zum Ausfallen der Albuminkomponente führt,

ist Dimethylsulfoxid. Die Umsetzung in diesem Lösungsmittel führt jedoch zu großen Problemen bei Isolierung und Reinigung der Produkte.
Ein besserer Weg führt über die Solubilisierung des Porphyrins zu reproduzierbaren Produkten. Hämin(mono)-Gly-His-OMe wird mit dem Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid in wässrige Lösung gebracht. Das UV-VIS-Spektrum der reduzierten Form in Abbildung 39 ist charakteristisch für das fünffach koordinierte Eisenzentralatom. Die Umsetzung mit der Humanserumalbumin-Lösung findet bei 20°C unter vorsichtigem Rühren innerhalb von 2 Stunden statt. Anschließend wird das Detergens durch Ultrafiltration entfernt. Als Membran wird eine Polyacrylmembran mit der Ausschlußgrenze 10 000 verwendet. Das albumingebundene Hämin(mono)-Gly-His-OMe kann durch Gefriertrocknung isoliert werden.

Diese Methode erlaubt die Fixierung von 2 Mol Hämin-Derivat pro Mol Albumin. Die Bindungsstellen im Albumin sind äquivalent, ein Affinitätsunterschied kann nicht festgestellt werden. Bei der Durchführung der Oxygenierungsuntersuchungen werden keine Wechselwirkungen zwischen den Porphyrin-Aktivzentren beobachtet. Die irreversible Autoxidation ist blockiert. Die Anzahl der koordinierten Hämin-Derivate wird nicht durch fehlende Bindungsstellen am Albumin limitiert, sondern durch die Komplexierungsmethode. Die Kapazität des Detergens ist relativ gering. In höherer Konzentration kann es wegen der drohenden Denaturierung des Albumins nicht angewendet werden.

Die Oxygenierungsuntersuchungen in Dimethylsulfoxid zeigen zunächst für die reduzierte Form das charakteristische Elektronenspektrum des sechsfach koordinierten Eisen-II-Zentralatoms (Abbildung 40). Das Häm-Dipeptid-Derivat ist also über einen Liganden an der sechsten Koordinations-

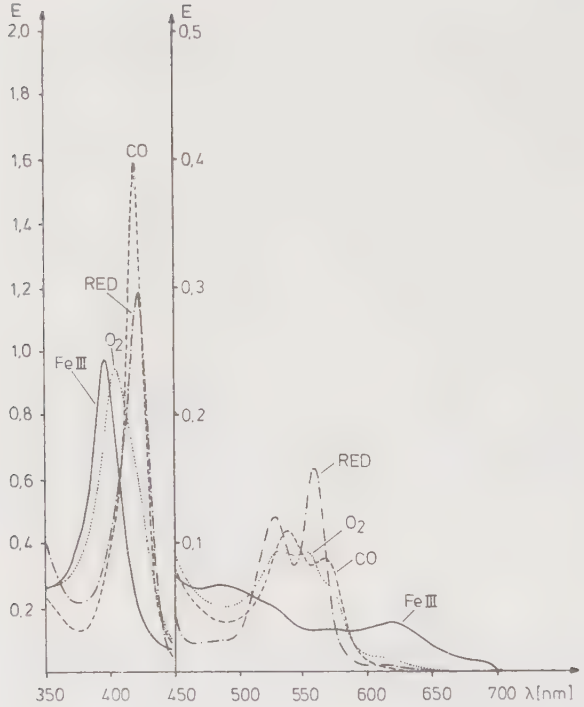


	Soret-Bande [nm]	ß-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	408	--	--
reduzierte Form (RED)	432	559	
CO-Komplex (CO)	422	540	570

Abb. 39: UV-VIS-Spektren von Häm(mono)-Gly-His-OMe in Phosph
Puffer pH 7.45 unter Zusatz von Cetyltrimethyl-
ammoniumbromid bei 23°C

stelle des Metalls mit dem Albumin verbunden. Aus der Analogie der Spektren der Dextran-Hämopolymere I und II, die Histidinliganden an der sechsten Koordinationsstelle aufweisen, kann auf einen Stickstoff-Liganden mit vergleichbarer Basizität geschlossen werden. Die Zugabe von Kohlenmonoxid führt zum vollständig reversiblen CO-Komplex. Der reduzierte Zustand wird durch mehrfaches Einfrieren unter Hochvakuum und Auftauen unter Argonatmosphäre wieder quantitativ erreicht. Sauerstoff-Zugabe führt zum Sauerstoff-Komplex, der durch dasselbe, mehrmals wiederholte Verfahren ebenfalls wieder in die reduzierte Form überführt werden kann, allerdings nicht mehr quantitativ. Dieses Oxygenierungsverhalten ist dem der Hämopolymere I und II völlig analog. Die Halbwertszeit des Sauerstoff-Komplexes kann wiederum aus der Extinktionsabnahme des CO-Komplexes nach zwei erfolgten Oxygenierungen bestimmt werden. Sie beträgt für das an Humanserumalbumin gebundene Häm(mono)-Gly-His-OMe in Dimethylsulfoxid bei 23°C 48 Minuten.

Wird albumingebundenes Hämin(mono)-Gly-His-OMe in Wasser reduziert, erhält man auch in diesem Medium das UV-VIS-Spektrum eines sechsfach koordinierten Häm-Eisen-II-Zentralatoms (Abbildung 43). Mit diesem Spektrum ist die koordinative Bindung von Häminderivaten über das Metallatom an Liganden der Albuminsequenz bewiesen. Bei der Reduktion in Dimethylsulfoxid könnte für die sechsfache Koordination des Eisen-II-Zentralatoms auch eine Beteiligung von Lösungsmittelmolekülen diskutiert werden, obwohl der schwache Ligand Dimethylsulfoxid kaum für das stark ausgeprägte Spektrum der reduzierten Form in Abbildung 40 verantwortlich gemacht werden kann. Diese Unsicherheit ist mit der gefundenen sechsfachen Koordination in Wasser beseitigt.



	Soret-Bande [nm]	β-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	397	--	--
reduzierte Form (RED)	427	530	559
CO-Komplex (CO)	422	540	570
oxygenierte Form (O_2)	407	535	555

Abb. 40: UV-VIS-Spektren des Komplexes Humanserumalbumin/ Häm(mono)-Gly-His-OMe in Dimethylsulfoxid bei 23°C

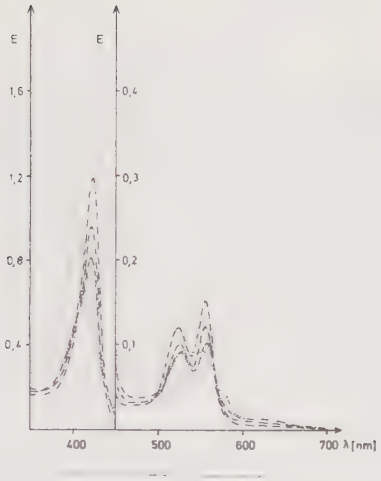


Abb. 41: UV-VIS-Spektren der oxygenierten Spezies aus 2 Oxygenierungszyklen

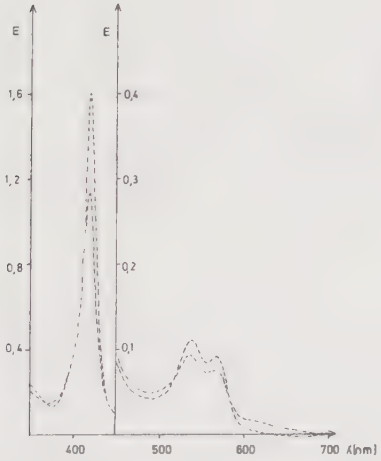
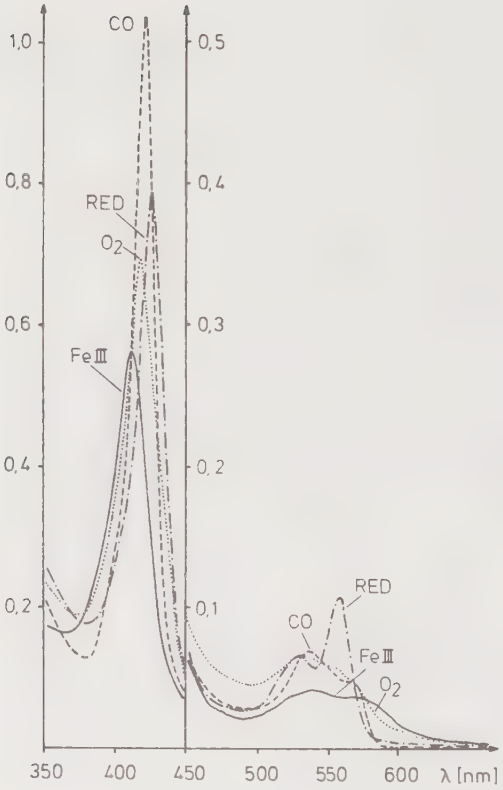


Abb. 42: UV-VIS-Spektren der CO-Komplexe aus 2 Oxygenierungszyklen



	Soret-Bande [nm]	β-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	412	--	--
reduzierte Form (RED)	428	531	560
CO-Komplex (CO)	421	538	571
oxygenierte Form (O_2)	418	530	554

Abb. 43: UV-VIS-Spektren des Komplexes Humanserumalbumin/ Hämin(mono)-Gly-His-OMe in bidestilliertem Wasser bei 23°C

Für den Mechanismus der Komplexierung von Hämin-Derivaten in Albumin ergibt sich die Schlußfolgerung, daß in einer der Komplexierung vorgelagerten Reaktion eine Konformationsänderung der Albuminkomponente stattfinden muß. Durch diese Veränderungen der Tertiärstruktur werden Aminosäurereste aus dem Innern des Proteins in die Lage versetzt, die sechste Koordinationsstelle am Eisen der Häm-Derivate einzunehmen. Die Elektronenspektren entsprechen völlig denen eines Häm(bis)-Imidazol-Komplexes. Die Bindungsstellen der Eisenporphyrine am Albumin sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit Histidine.

Die Sauerstoffkomplexe des albumingebundenen Häm(mono)-Gly-His-OMe und der Dextran-Hämopolymere I und II in Dimethylsulfoxid haben Halbwertszeiten, die in derselben Größenordnung liegen. Auch bei dem albumingebundenen System muß die langsame, irreversible Oxidation bei Raumtemperatur auf die Nebenreaktion des Reduktionsmittels Dithionit-Kronenether mit Sauerstoff zurückgeführt werden. In wässriger Lösung ist die Abschirmung des Häm-Aktivzentrums durch das Humanserumalbumin soweit verbessert, daß das Elektronenspektrum des Sauerstoffkomplexes gemessen werden kann. Der Komplex wird jedoch innerhalb weniger Minuten vollständig zur Eisen-III-Verbindung oxidiert. Die protonenkatalysierte Oxidation wird durch die Komplexierung in Albumin zwar verlangsamt, aber nicht völlig verhindert.

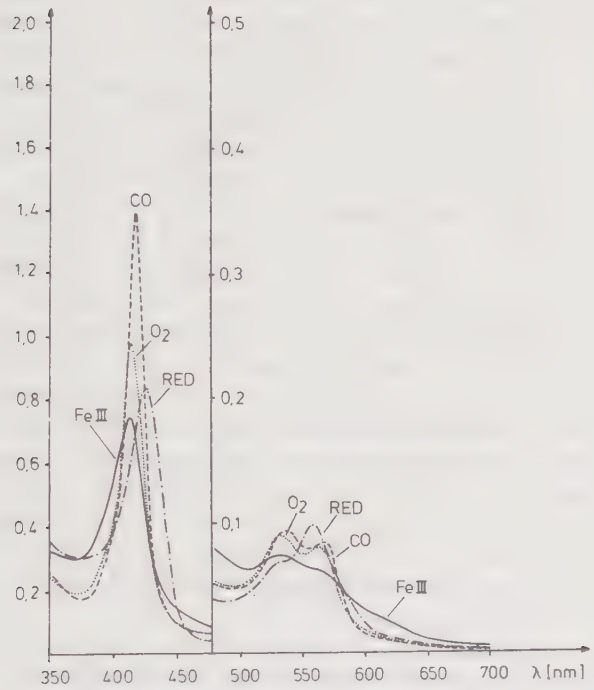
Aus den Elektronenspektren der Abbildungen 40 bis 43 erhält man keinen Hinweis, mit welchem Liganden Kohlenmonoxid und Sauerstoff um eine der axialen Bindungsstellen am Eisen konkurrieren. Eine Aufhebung der Fixierung am Albumin und damit der Solubilisierung von Häm(mono)-Gly-His-OMe findet nicht statt. Ob außer der Koordination am Eisen-Zentralatom noch andere Wechselwirkungen zur

Bindung an Albumin beitragen kann, auf Grund der Elektronenspektren nicht entschieden werden.

5.3. Gelatinegebundenes Häm(mono)-Gly-His-OMe

Partiell hydrolysierte und vernetzte Gelatinen haben neben den klinischen Dextranen eine große Bedeutung als Blutplasma-Ersatzstoffe erlangt. Es handelt sich dabei um chemisch modifizierte Rinderknochen-Gelatine. Durch thermischen Abbau erhält man Polypeptide mit mittleren Molmassen von 12 000 bis 15 000, die mit Diisocyanatverbindungen quervernetzt werden. Die Moleküle erhalten dadurch eine annähernd globuläre Gestalt[71]. Die Quervernetzung erfolgt über die Seitenketten der basischen Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin, Arginin und Histidin. Die ε-Aminogruppe des Lysins ist die reaktivste Gruppe. Durch Addition an Isocyanat-Verbindungen entstehen Harnstoff-Brücken. Die vernetzte Gelatine mit einer mittleren Molmasse von 35 000 ist physiologisch gut verträglich.
Gelatine enthält 0.8 % Histidin bezogen auf 100 g wasser- und aschefreies Protein[117]. In der modifizierten Form sind im Mittel zwei Histidin-Reste pro Molekül vorhanden.

Die Solubilisierung von Hämin(mono)-Gly-His-OMe durch die Gelatine gelingt mit derselben Methode, die für die Komplexierung in Albumin entwickelt wurde. Das Hämin-Dipeptid wird mit dem Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid in wässrige Lösung gebracht und mit einer 3.5 prozentigen kolloidalen Gelatinelösung (Haemaccel 35) umgesetzt. Durch Ultrafiltration mit einer Polysulfonmembran (Ausschlußgrenze 10 000) kann das Detergens entfernt werden. Im Filtrat kann Cetyltrimethylammoniumbromid nachgewiesen werden. Nach Umsetzung mit Silberoxid wird durch Hofmann-Eliminierung das 1-Hexadecen erhalten, das gaschromatographisch nachgewiesen werden kann.



	Soret-Bande [nm]	β-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	413	--	--
reduzierte Form (RED)	428	533	559
CO-Komplex (CO)	420	538	569
oxygenierte Form (O_2)	415	531	563

Abb. 44: UV-VIS-Spektren des gelatinegebundenen Häm(mono)-Gly-His-OMe in bidestilliertem Wasser bei 23°C

Die modifizierte Gelatine enthält nur 2 Histidinreste pro Molekül gegenüber 16 im Humanserumalbumin. Die maximal erreichbare Beladung mit Porphyrin-Derivaten ist entsprechend niedriger. Mit einem Mol Gelatine können 0.5 Mol des Hämin-Derivats solubilisiert werden. Ein Teil der Histidinreste ist durch die Diisocyanat-Vernetzung über die basischen Imidazol-Seitenketten für die Komplexierung verlorengegangen. Das UV-VIS-Spektrum des gelatinegebundenen Häm(mono)-Gly-His-OMe in Wasser (Abbildung 44) weist auf einen nur schwach koordinierenden sechsten Liganden hin. Die α/β-Banden sind nicht so stark ausgeprägt wie in dem albuminverknüpften System. Bei der Oxygenierungsuntersuchung kann ein Sauerstoffkomplex gemessen werden, der allerdings schnell irreversibel oxidiert wird. Die im Vergleich zum albumingebundenen Häm(mono)-Gly-His-OMe etwas verbreiterten Banden können durch die weniger spezifische, leicht variierende Umgebung der Histidin-Imidazol-Liganden in der modifizierten Gelatine erklärt werden.

5.4. Synthese des Aktivzentrums Häm(mono)-methylimidazolpentylamid

In verschiedenen Untersuchungen über das Komplexbildungsverhalten von Protohäm- und Deuterohäm-Dimethylestern wird 2-Methylimidazol als nicht-kovalent gebundener, externer Ligand im Überschuß verwendet[118-120]. Durch den positiven induktiven Effekt der Methylgruppe wird die Basizität des Imidazol-Liganden erhöht. Durch kovalente Bindung des 2-Methylimidazols über eine Pentylaminogruppe an eine Propionsäuregruppe, erhält man eine Verbindung, die den Aktivzentren der Dextran-Hämopolymere und der proteingebundenen Häm-Derivate vergleichbar ist. Die Länge der Methylenkette garantiert eine gute Koordination des Imidazolringes mit einem Minimum an Ringspannung, analog der Glycin-Histidin-Anordnung in den Häm-Dipeptid-Derivaten.

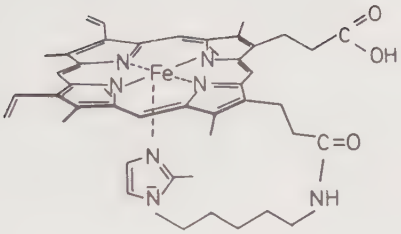
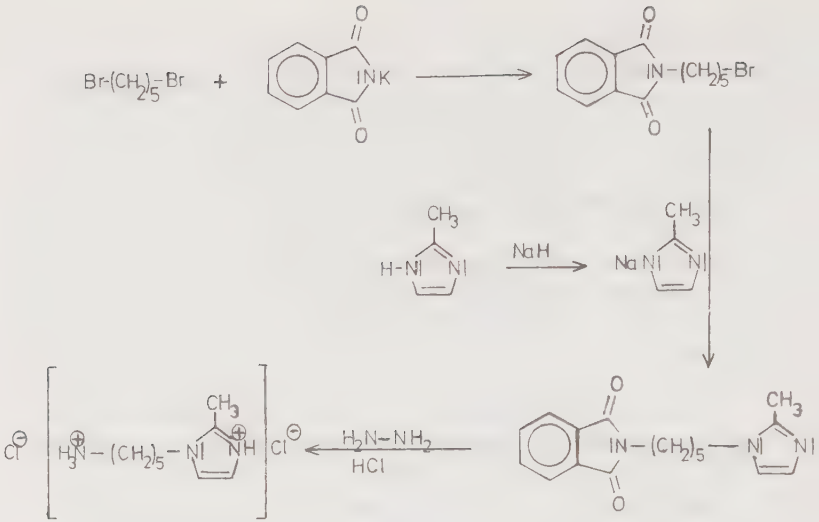


Abb. 45: Häm(mono)-5-N-(2-methylimidazol)pentylamid(1)

Der Ligand 1-Amino-5-N-(2-methylimidazol)-pentan (Methylimidazolpentylamin) wird nach einem Vorschlag von Tsuchida und Mitarbeitern[121] hergestellt. Die Synthese ist jedoch unvollständig beschrieben und muß erheblich verbessert und um dünnschichtchromatographische und ^{13}C-NMR-spektroskopische Angaben ergänzt werden (vgl. experimenteller Teil).

Aus 1,5-Dibrompentan erhält man im ersten Schritt einer Gabriel-Synthese das 1-Phthalimido-5-brom-pentan, das von 1,5-Bisphthalimidopentan und anderen Nebenprodukten mit Petrolether 30/50 abgetrennt werden kann. Aus 2-Methylimidazol erhält man mit 99 prozentigem Natriumhydrid in absolutem Toluol das 2-Methylimidazol-Anion und durch nucleophile Substitution das 1-Phthalimido-5-N-(2-methylimidazol)-pentan ohne Nebenprodukte. Nach der Hydrazinolyse des Phthalsäurerestes wird die gewünschte Verbindung als Dihydrochlorid isoliert. Das Felddesorptions-Massenspektrum zeigt den Molpeak $M^{\oplus}$ des freigesetzten Methylimidzolpentylamins (m/z 167). Für die weiteren Reaktionen kann die Verbindung aus dem Dihydrochlorid mit Natriummethylat in absolutem Methanol freigesetzt werden.



Die Bindung der freigesetzten, primären Aminogruppe des Liganden an eine Propionsäuregruppe des Hämins erfolgt durch die Aktivierungsmethode mit Chlorameisensäureethylester in Dimethylformamid. Die Reaktionsprodukte werden durch Ausfällen in gekühltem, absolutem Diethylether isoliert. Im FD-Massenspektrum (Abbildung 46) erhält man die $(M+1)^{\oplus}$-Signale des Hämin(mono)-methylimidazolpentylamids (m/z 766) und des Hämin(bis)-methylimidazolpentylamids (m/z 915) neben dem schwächeren $M^{\oplus}$-Signal für unumgesetztes Hämin (m/z 616).

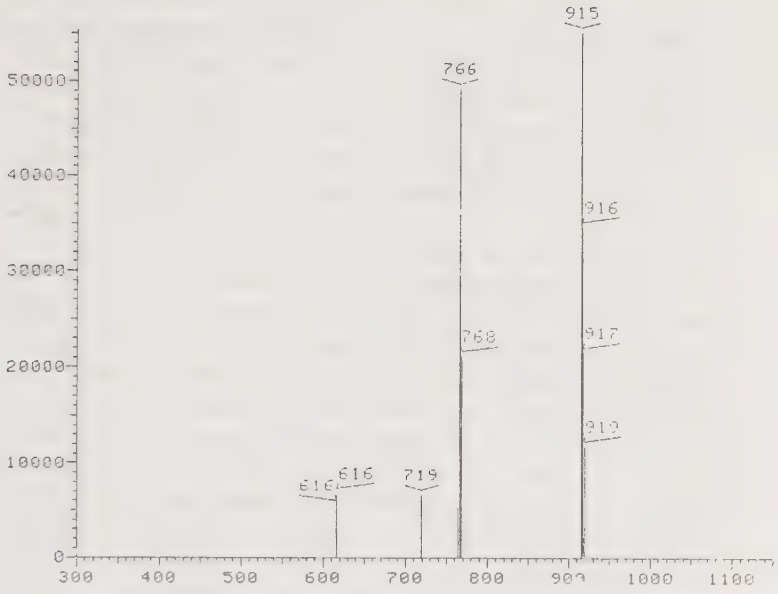


Abb. 46: FD-Massenspektrum des Produktgemisches aus der Reaktion Hämin/Methylimidazolpentylamin, gelöst in Chloroform/Methanol 2/1

Die Trennung des Produktgemisches durch Säulenchromatographie an Kieselgel scheitert. Auch die Zumischung von Triethylamin zum Eluens bringt keine Verbesserung. Mit der Trennung der Hämin-Dipeptid-Derivate (vgl. Kapitel 5.1.) ist offenbar die Grenze der Möglichkeiten für Kieselgel als stationäre Phase erreicht. Für Derivate mit stärker basischen Imidazolliganden kann Kieselgel wegen seines sauren Charakters nicht eingesetzt werden. Auch eine Chromatographie an Aluminiumoxid scheidet wegen der freien Propionsäuregruppe des Mono-Derivates aus.

Die Trennung des Produktgemisches gelingt jedoch, wenn das Reversed-Phase Material RP 18 als stationäre Phase verwendet wird. Als Eluens dient das Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Chloroform/Methanol im Verhältnis 4/2/1. Die Zuordnung der Fraktionen kann dünnschichtchromatographisch mit RP 18-DC-Platten erfolgen, die Charakterisierung gelingt durch die FD-Massenspektren.

Ein alternativer Syntheseweg geht vom Protoporphyrin IX aus. Nach Aktivierung mit Chlorameisensäureethylester und kovalenter Kupplung der Liganden, können die eisenfreien Protoporphyrin-Methylimidazolpentylamid-Derivate erhalten werden. Nach deren chromatographischer Trennung erhält man durch den Einbau des Eisen-Zentralatoms die entsprechenden Hämin-Derivate. Für die Trennung der Protoporphyrin-Derivate werden jedoch dieselben Probleme beobachtet, die auch bei der Trennung der Hämin-Derivate auftreten. Die kostspielige Chromatographie an Reversed-Phase Material kann so nicht umgangen werden. Da sich die Herstellung von Protoporphyrin IX aus Hämin[122] als sehr aufwendig erweist und käufliches Protoporphyrin sehr teuer ist und noch erhebliche Mengen Hämin enthält, bringt diese Methode gegenüber der direkten Verknüpfung der Liganden mit Hämin nur Nachteile mit sich.

Hämin(mono)-methylimidazolpentylamid ist eines der wenigen wasserlöslichen Porphyrinderivate. In Phosphat-Puffer pH 7.5 gelöst, läßt es sich ohne Detergenzienzusatz mit wässriger Humanserumalbumin-Lösung vermischen. Das System wird mit Stickstoff gesättigt und mit verdünnter Natriumdithionit-Lösung reduziert. Das UV-VIS-Spektrum des Häm(mono)-methylimidazolpentylamids zeigt jedoch keinerlei Einfluß eines Albuminliganden. Es kann weder ein Sauerstoffkomplex noch ein CO-Komplex beobachtet werden. Der Versuch, das albumingebundene System durch Gefriertrocknung zu isolieren, führt zu keinem einheitlichen Produkt.

Eine Erklärung für diese überraschende Instabilität des gesamten Systems kann aus einer erst kürzlich publizierten Untersuchung eines verwandten Häm-Komplexes abgeleitet werden: der ramanspektroskopischen Untersuchung des Häm-[3-N-(2-methylimidazol)propylamid][methylesters][123]. Die Bindung zum Eisenzentralatom ist im fünffach koordinierten Zustand durch die hohe Basizität des 2-Methylimidazol-Liganden verstärkt. Das Eisenatom ist weit aus der Porphyrinringebene heraus in Richtung zum fünften Liganden gerückt. Beim Übergang zum sechsfach koordinierten Komplex, d.h. beim Übergang vom high-spin zum low-spin-Komplex mit sechs kurzen Bindungen, wird die Imidazol-Eisen-Bindung durch einen gegenläufigen sterischen Effekt erheblich geschwächt. Die Methylgruppe am Imidazolring stellt wegen der sterischen Wechselwirkung mit dem Porphyrinring ein erhebliches Hindernis gegen das Zurückrücken des Eisenatoms in die Porphyrinringebene dar. Weder die Histidinreste des Albumins noch Sauerstoff oder Kohlenmonoxid sind ausreichend starke Liganden, um gegen diese Energiebarriere die sechsfache Koordination durchsetzen zu können. Das Aktivzentrum Häm(mono)-methylimidazolpentylamid ist daher als Modellverbindung für reversible Komplexierungsreaktionen völlig ungeeignet.

6. Liposomenverkapseltes Hämderivat

Aus der in Kapitel 5 vorgestellten Technik, wasserunlösliche Porphyrine mit dem kationischen Micellenbildner Cetyltrimethylammoniumbromid in wässrige Lösung zu überführen, ergibt sich die Überlegung, ob die in letzter Zeit vielfach erprobte Methode der Liposomenverkapselung eine Möglichkeit zur Solubilisierung von Porphyrinsystemen darstellt. Micellenbildende Detergenzien ordnen sich mit ihren hydrophoben Kohlenwasserstoffketten so an, daß für das

Porphyrin ein hydrophober Innenraum entsteht. Die hochmolekularen Assoziate sind wegen ihrer hydrophilen Oberfläche wasserlöslich. Micellen haben nur eine Lebensdauer im Millisekundenbereich[124]. Sie unterliegen fortwährender Dissoziation und Neubildung. Wird der Detergensgehalt durch Ultrafiltration oder Dialyse unter eine kritische Konzentration gesenkt, lösen sich die Aggregate auf. Dieser Effekt wird im vorigen Kapitel zum Transfer der Porphyrine an die Proteine genutzt.
Im Gegensatz zu den Micellen sind Liposomen stabile Gebilde. Sie entstehen aus amphiphilen Lipiden, die in Wasser zunächst zu Lipid-Doppelschichten aggregieren. Die Lipide bilden auf diese Weise im Innern der Doppelschicht eine hydrophobe Matrix, während die hydrophilen Kopfgruppen der umgebenden Wasserphase zugewandt sind. Die Doppelschichten können durch Phasentransfer-Bedingungen oder Ultraschalleinwirkung zu einer noch weitergehenden Aggregation gezwungen werden. Es bilden sich kugelförmige Vesikel. Als Liposomen werden Vesikel bezeichnet, die aus natürlich vorkommenden Phospholipiden gebildet werden.

Verschiedene in Vesikeln eingelagerte Porphyrine und deren Zink-Komplexe sind beschrieben worden[125]. Auf der Basis der "picket-fence"-Porphyrine ist ein System entwickelt und in Liposomen gebunden worden, das ein mit vier "Phosphocholin"-Gruppen meso-substituiertes Porphyringerüst besitzt[126,127]. Als fünfter Ligand am Eisenzentralatom wird 1-Laurylimidazol im Liposom mit eingeschlossen. Auch Hämin-Derivate sind in Phospholipidmembranen eingeschlossen worden[128]. Die Vesikelbildung erfolgt bei den beschriebenen Systemen durch Ultraschalleinwirkung.

Eine wesentlich schonendere Methode zur Liposomenbildung ist die Detergens-Dialyse-Technik. Ihre Anwendung für die Einbettung des Aktivzentrums Hämin(mono)-Gly-His-OMe in

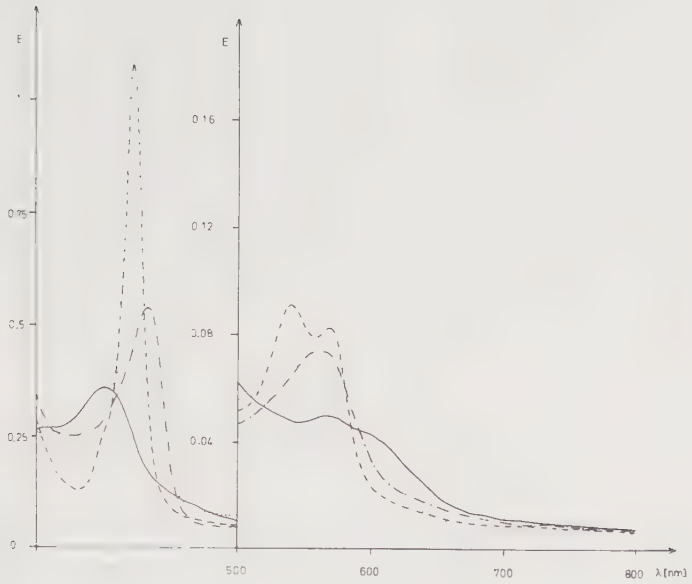
Liposomen bietet sich an, da diese Methode Analogien zur Detergens-Ultrafiltrations-Technik aufweist, mit der die Bindung an Proteine durchgeführt wurde. Das Lipid, das Porphyrin und das Detergens Natriumcholat werden im Lösungsmittelgemisch Methylenchlorid/Methanol 2/1 gelöst. Nach Entfernung der organischen Lösungsmittel verbleibt ein Lipidfilm, der sich in wässriger Pufferlösung unter Bildung von gemischten Lipid-Detergens-Micellen löst. Das Detergens Natriumcholat kann in einem Durchfluß-Dialyse-Gerät gegen Puffer dialysiert werden. Man erhält auf diese Weise kleine, unilamellare Liposomen, die sich durch große Homogenität auszeichnen. Obwohl die Molmasse von Hämin(mono)-Gly-His-OMe (860) deutlich kleiner als die Ausschlußgrenze der Dialysemembran (5 000) ist, gelingt die Einbettung des Häminderivats in Liposomen aus hydriertem Lecithin oder Dimyristoyl-phosphatidylcholin. Durch den großen, ebenen Porphyrinring wird gegenüber der Membran ein wesentlich größeres Molekül vorgetäuscht. Die erhaltenen Liposomen werden durch Gelchromatographie gereinigt. Dabei erweist sich, daß das Porphyrin mit den Liposomen vergesellschaftet ist und nicht, wie beispielsweise aus einer micellaren Lösung, durch Gelchromatographie wieder abgetrennt werden kann.

Die Detergens-Dialyse-Technik besitzt für die Einbettung von Porphyrinen in Liposomen eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Ultraschallmethode. Die Vesikelbildung gelingt trotz der Verwendung des geladenen Eisen-III-Protoporphyrinderivats. Der Einbau des reduzierten, ungeladenen Eisen-II-Komplexes würde einen sehr großen, apparativen Aufwand erfordern.
Die Methode vermeidet drastische Reaktionsbedingungen. Man erhält daher sehr stabile Liposomen. Bei Lagerung bei +4°C zeigt sich erst nach etwa zwei Monaten eine Trübung der Lösung. Das Eisenzentralatom der gebundenen Porphyrin-

systeme kann durch Natriumdithionit reduziert werden, die Sauerstoff- und Kohlenmonoxid-Komplexbildungen können durchgeführt werden, ohne daß die Stabilität der Liposomen beeinträchtigt wird.

Das UV-VIS-Spektrum des reduzierten Aktivzentrums Häm(mono)-Gly-His-OMe in Liposomen aus Dimyristoyl-phosphatidylcholin (Abbildung 47) zeigt die erwartete fünffache Koordination des Eisenzentralatoms an. Die Porphyrine sind in der Vesikelmembran isoliert. Sie haben untereinander keine Wechselwirkungen mehr. Kohlenmonoxid-Koordination an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens führt zu einer starken Extinktionszunahme der Soret-Bande und zum Auftreten der α/β-Banden im sichtbaren Bereich des Spektrums. Der Kohlenmonoxid-Komplex ist vollständig reversibel. Durch wiederholtes Evakuieren und Einleiten von Argon wird der reduzierte Zustand quantitativ wieder erhalten. Das Spektrum eines sechsfach koordinierten Oxo-Komplexes kann nach Sauerstoffzugabe nicht beobachtet werden. Werden kleine, definierte Volumina Sauerstoff in die Lösung injiziert, kann die stufenweise Oxidation des Aktivzentrums durch den Übergang der Spektren der reduzierten Form in die oxidierte Form verfolgt werden (Abbildung 48). Die protonenkatalysierte Oxidation verläuft in der wässrigen Liposom-Lösung sehr schnell. Der am Aktivzentrum koordinierte Sauerstoff wird protoniert, das gebildete Hyperoxid-Radikal dissoziiert sofort.

Aus der beobachteten mangelhaften hydrophoben Abschirmung des Aktivzentrums folgt, daß das Porphyrin-Derivat in einer Region der Lipid-Doppelschicht gebunden ist, die für Hydroxonium-Ionen zugänglich ist. Bei proteinhaltigen biologischen Zellmembranen wird unterschieden zwischen integralen Proteinen, die in der hydrophoben Matrix der Membran gebunden sind, und peripheren Proteinen, die sich an den



	Soret-Bande [nm]	β-Bande [nm]	α-Bande [nm]
oxidierte Form (Fe III)	400	-	-
reduzierte Form (RED)	432	562	
CO-Komplex (CO)	422	540	567
oxygenierte Form (O_2)	428	553	

Abb. 47: UV-VIS-Spektren des liposomgebundenen Häm(mono)-Gly-His-OMe in Pufferlösung pH 7.2 bei 23°C

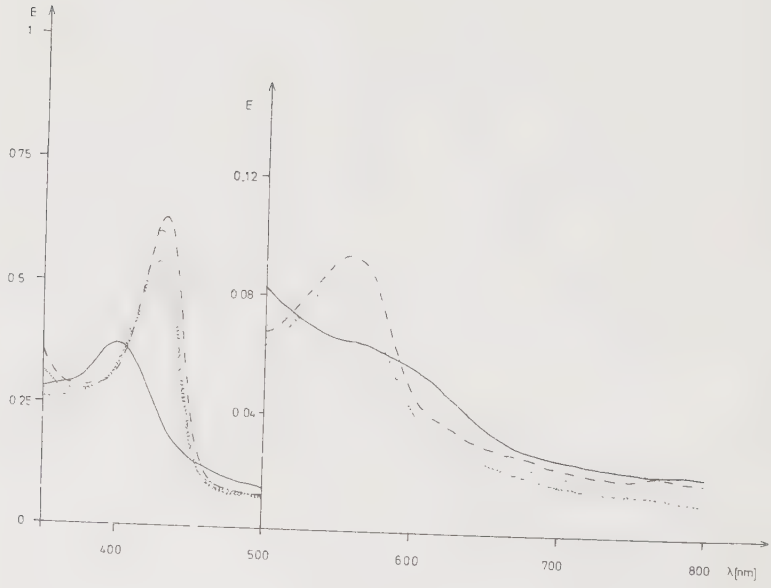


Abb. 48: UV-VIS-Spektren des liposomgebundenen Häm(mono)-Gly-His-OMe bei schrittweiser Sauerstoff-Zugabe in Pufferlösung pH 7.2 bei 23°C

hydrophilen Kopfgruppen der Lipide anlagern. Die integralen Proteine sind geschützt gegen den Angriff wasserlöslicher Reagenzien, die peripheren nicht. In Vesikeln aus synthetischen Amphiphilen konnten durch regioselektive Einlagerung Porphyrinsysteme mit unterschiedlich hydrophober Umgebung erhalten werden[129]. Man unterscheidet in wässrigen Vesikellösungen 9 Regionen (vgl. Abbildung 50). Periphere Porphyrine werden in den Regionen 2 oder 4 in der Umgebung der Kopfgruppen angelagert. Sie können durch Säurezugabe protoniert werden. Integrale Porphyrine sind im hydrophoben Innenraum 5 eingebettet, sie können nicht protoniert werden.

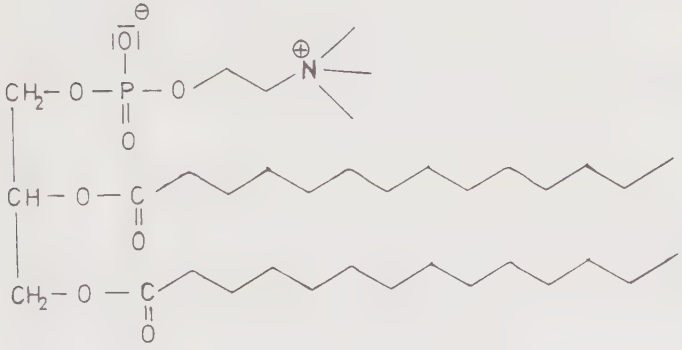
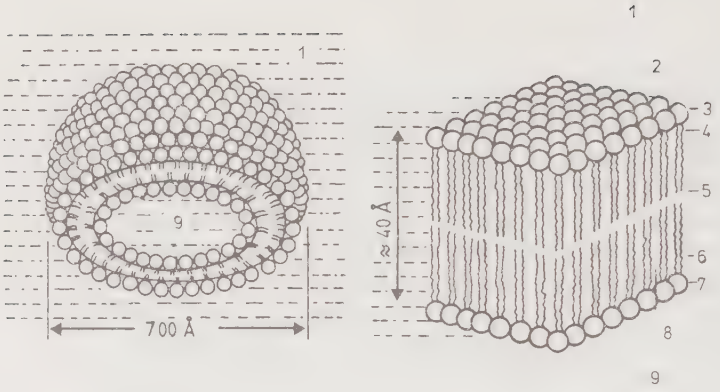


Abb. 49: Dimyristoyl-phosphatidylcholin

Die prosthetische Gruppe Häm(mono)-Gly-His-OMe ist ambifunktionell und amphiphil. Das geladene 'organische' Salz hat eine freie Carboxylgruppe und eine koordinierte, basische Imidazolgruppe. Trotz dieser polaren Substituenten ist der Komplex nicht wasserlöslich. Man könnte ihn daher im hydrophoben Innenraum der Lipid-Doppelschicht er-



1 äußeres Wasservolumen
2 + 8 Hydratationssphäre
3 + 7 Kopfgruppen
4 + 6 hydrophobe Membran
5 hydrophober Innenraum
9 inneres Wasservolumen

Abb. 50: Unilamellares Liposom und Ausschnitt aus der Doppelschicht-Lipidmembran[129)]

warten. Aus der raschen Oxidation des reduzierten Aktivzentrums durch Sauerstoff muß jedoch abgeleitet werden, daß das Aktivzentrum in der Nähe der Lipid-Kopfgruppen, wahrscheinlich in der Region 4, eingelagert ist. In diesem Bereich reicht der hydrophobe Schutz noch nicht aus, um die Protonenübertragung auf ein koordiniertes Sauerstoffmolekül und die Dissoziation des Hyperoxid-Radikals zu verhindern. Für Porphyrinsysteme mit weniger stark ausgeprägtem amphiphilen Charakter kann die Einlagerung im hydrophoben Innenraum erwartet werden.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Die Liposompräparationen wurden durchgeführt von Herrn Jürgen Haab im Arbeitskreis von Prof. Roth am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen. Herrn J. Haab und Frau L. Schweikert danke ich für die gute Zusammenarbeit.
Für die schwierige Aufnahme der FD- und FAB-Massenspektren der Porphyrinsysteme danke ich Herrn H. Bartholomä und Herrn R. Müller.
Die Polyacryl- und Polysulfon-Ultrafiltrationsmembranen verdanke ich Herrn W. Schumann.
Der HPLC-Abteilung danke ich für das Reversed-Phased-Kieselgel RP 18, das von J. Reiners hergestellt wurde.

2. Geräte

UV-VIS:	Beckman Acta M VII und Perkin Elmer Lambda 5
NMR:	Bruker WM 400, WH 90, HFX 90 und WP 80
MS:	Varian MAT 711
IR:	Beckman-Spektrometer IR 12 und 4250, Perkin Elmer Infracord
Aminosäureanalyse:	Biotronic LC 6 000
Elementaranalyse:	Perkin Elmer 240
Gaschromatographie:	Carlo Erba Fractovap 2101, FID-Detektor
präparative Niederdruck-Chromatographie-Anlage:	eigene Entwicklung des Arbeitskreises Prof. Bayer[130)]

Detektor:	Gilson HM/HPLC Holochrome
Fraktionssammler:	Gilson 201
Ultrafiltrationszellen:	Amicon Oosterhout
Lyophilisator:	Continuous Freeze Dryer New Brunswick
pH-Meter und Dosimat:	Metrohm, Herisau
Schmelzpunktsbestimmung:	Büchi Typ SMP 20
Gelchromatographie:	Pharmacia-Säulen, LKB-Detektor und Fraktionssammler 2089 Uvicord III
Molekulargewichtsbestimmung:	Schott-Kapillar-Viskosimeter
Photolyse:	Quecksilber-Tauchlampe in doppelwandigem Quarzgefäß, Hanau Typ Q, 150 Watt

Für die Aufnahme der Spektren und die Anfertigung der Analysen danke ich Frau M. Munari und Frau K. Reichle (ASA), Frau E. Lücke (IR), Herrn J. Wurmstich (EA), Herrn W. Müller (90 MHz-NMR), den Herren R. Müller und R. Bretthauer (400 MHz-NMR) sowie den Damen und Herren der NMR-Abteilung für die Routinespektren.

3. Chemikalien

Grundchemikalien und Reagenzien:	Firmen Merck, Merck-Schuchardt, Fluka, Ega-Aldrich und Sigma
Spezielle Chemikalien:	Dextran 32 pharm.-pyrogenfrei (Fa. Serva); Dextran T 40 und T 70 (Fa. Pharmacia) Humanserumalbumin (Hochschulspende der Behringwerke)

	modifizierte Gelatine-Lösung Haemaccel 35 (Behringwerke)
	Dimyristoyl-phosphatidylcholin (Fa. Sigma)
	Kronenether 18-Krone-6 (Fa. Ega-Aldrich)
Lösungsmittel:	Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Literaturvorschriften[131,132] getrocknet und gereinigt
Gase:	Phosgen zur Synthese wurde einer Laborgasbombe der Fa. Merck-Schuchard entnommen. Für die Arbeiten unter Schutzgas wurden Argon (spezial) und Dreiring-Stickstoff der Fa. Messer-Griesheim verwendet. Stickstoff wurde zusätzlich über Chromtrioxid auf Silikagel[133] gereinigt.
Dünnschichtplatten:	Kieselgel 60 F_{254} (Fa. Merck) Aluminiumoxid 60 F_{254}, Typ E (Fa. Merck) RP-18 F_{254} S (Fa. Merck)
Säulenmaterial:	Kieselgel Si60 63-200 µm (Fa. Macherey Nagel) Kieselgel Si60 32-63 µm (Fa. Merck) Reversed-Phase RP-18 25-40 µm Li Chroprep Si60 25-40 µm (Fa. Merck)
Gelchromatographie:	Sephadex G 75 (Fa. Pharmacia)

4. Dextran-Hämopolymere

4.1. Funktionalisierung von Dextran

4.1.1. Dextran-Carbonat

Einer konzentrierten Lösung von getrocknetem Dextran ($\overline{M}_\eta$ = 44 800) in absolutem DMSO (5 g = 0.11 mMol in 50 ml) werden 15 ml Dioxan und 25 ml Triethylamin zugetropft. Die Mischung wird auf 14°C gekühlt. Unter starkem Rühren werden 1.1 ml Chlorameisensäureethylester (11.5 mMol) in 5 ml absolutem Dioxan so langsam zugetropft, daß die Reaktionstemperatur 14°C nicht überschreitet. Die Reaktionsmischung wird noch 5 Minuten gerührt und dann langsam und unter Kühlung mit konz. HCl neutralisiert. Die Reaktionslösung wird dann unter Rühren in 1 l Ethanol gegossen. Dextran-Carbonat fällt aus, wird abfiltriert, mit Ethanol und Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das Produkt in 50 ml DMSO gelöst und wie oben beschrieben gefällt und isoliert. Die Ausbeute an Dextran-Carbonat beträgt 4.7 g (94 % d.Th.).

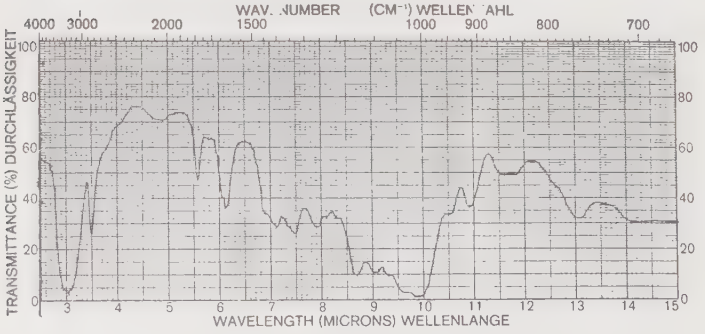


Abb. 51: IR-Spektrum (KBr) von Dextran-Carbonat

4.1.2. Aminodextran[134)]

Frisch hergestelltes Dextran-Carbonat wird in DMSO gelöst (5 g in 45 ml DMSO) und einer Reaktionsmischung aus DMSO, H_2O und Ethylendiamin (50 ml/13 ml/13 ml) unter Rühren zugetropft. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wird unter Rühren in 1 l Ethanol gegossen. Amino-Dextran fällt aus, wird abfiltriert, mit Ethanol und Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das Produkt in 50 - 70 ml DMSO gelöst und wie oben beschrieben gefällt und isoliert. Die Umfällung wird nochmals wiederholt. Die Ausbeute an Aminodextran beträgt 4.6 g oder 91 % bezogen auf Dextran.

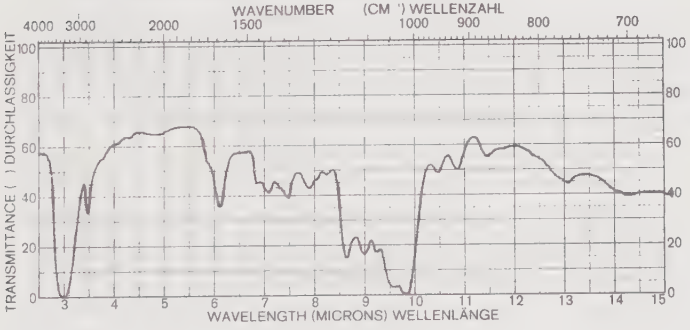


Abb. 52: IR-Spektrum (KBr) von Aminodextran

Zur weiteren Synthese der Dextran-Hämopolymere wurde Aminodextran mit den nachfolgend beschriebenen Daten verwendet:
EA: C 40.99 H 6.27 N 0.77
Anzahl der freien Aminogruppen pro Molekül: 12.9

Mittlere Molmasse pro freier Aminogruppe: 3490
Substitutionsgrad γ = 4.6 %.

4.1.3. 2,4-Dinitrophenyl-Derivatisierung[135)]

100 mg Aminodextran (0.029 mMol bezogen auf die mittlere Molmasse pro Aminogruppe) werden in 1 ml DMSO abs. gelöst und mit 0.1 ml Triethylamin versetzt. Unter Rühren wird vorsichtig eine Lösung von 50 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol (0.27 mMol) in 0.3 ml Ethanol zugetropft. Die Reaktionsmischung wird unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Ethanol wird das ausgefallene DNP-Derivat abzentrifugiert. Zur Eliminierung des Dinitrofluorbenzol-Überschusses muß das Derivat 10 x mit Ethanol und 1 x mit Ether gewaschen und abzentrifugiert werden. Das Derivat wird in 1 ml DMSO gelöst, mit Ethanol gefällt, 6 x mit Ethanol und 1 x mit Ether gewaschen, abzentrifugiert, unter Lichtausschluß getrocknet und aufbewahrt. Das UV-Spektrum weist ein Absorptionsmaximum bei 364.2 nm auf, der Extinktionskoeffizient beträgt ε = 17 400 l/Mol cm.

4.1.4. NBOC-Aminosäurederivate

Darstellung des Chlorameisensäure-o-nitrobenzylesters (NBOC-Cl)

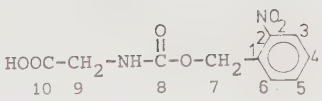
In eine Lösung von 20 g o-Nitrobenzylalkohol (0.13 Mol) in 160 ml 1,4-Dioxan wird über mehrere Stunden soviel Phosgen eingeleitet, bis das Volumen der Lösung um 100 ml zugenommen hat. Die Reaktionslösung wird über Nacht gerührt. Der Phosgenüberschuß wird durch Einleitung von Stickstoff ausgetrieben und in Natronlauge-Waschflaschen absorbiert. Wenn das Lösungsvolumen den Ausgangswert wieder erreicht hat, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, wobei die Badtemperatur unter 40°C gehalten wird. NBOC-Cl

fällt als gelbliche, ölige Flüssigkeit an, die im Vakuum getrocknet wird und im Tiefkühlschrank bei -15°C kristallisiert. Die Reaktion verläuft nahezu quantitativ mit einer Ausbeute von 27.8 g (99 % d.Th.). Das Produkt enthält nur geringe Spuren o-Nitrobenzylkohlensäurediester (R_f = 0.65 , CH_2Cl_2). NBOC-Cl wird in abs. Dioxan gelöst unter Stickstoff und Lichtausschluß aufbewahrt, wenn möglich aber sofort umgesetzt. Während der gesamten Darstellung, besonders bei der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, müssen Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden, die das Freisetzen von Phosgen verhindern. Dies kann durch mehrere Natronlauge-Waschflaschen zwischen Rotationsverdampfer und Vakuumpumpe erreicht werden.

Darstellung der NBOC-Aminosäurederivate

0.04 Mol der entsprechenden Aminosäure werden in einer Mischung aus 50 ml H_2O, 10 ml 4 n Natronlauge (0.04 Mol), 40 ml 5 % Natriumcarbonat-Lösung und 30 ml Dioxan gelöst. Zu dieser Lösung werden 9.1 g NBOC-Cl (0.042 Mol) in 60 ml Dioxan und 10.5 ml 4 n Natronlauge (0.042 Mol) in 5 jeweils gleichen Portionen innerhalb von 40 Minuten zugegeben. Die Reaktionslösung wird dabei gekühlt und nach der letzten Zugabe noch 20 Minuten bei 0°C gerührt. Bei der Darstellung des Di-NBOC-Histidins müssen die doppelten Mengen NBOC-Cl und Natronlauge eingesetzt werden. Nach Zugabe von 100 ml Essigester wird mit 6 n HCl neutralisiert. Beim Ansäuern löst sich ein eventuell auftretender Niederschlag wieder auf. Das Produkt wird mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphasen werden mit H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung wird eingeengt und mit wenig Petrolether 30/50 versetzt. Im Tiefkühlschrank bei -30°C kristallisiert das Produkt aus, wird abfiltriert und getrocknet.

o-Nitrobenzyloxycarbonyl-Glycin
(NBOC-Gly):
Ausbeute: 8.3 g (82 % d.Th.),
weiße Kristalle, F. 120.5°C



EA $C_{10}H_{10}N_2O_6$ (254.2)

ber. (%): C 47.25 H 3.97 N 11.02
gef. (%): C 47.75 H 4.14 N 10.99

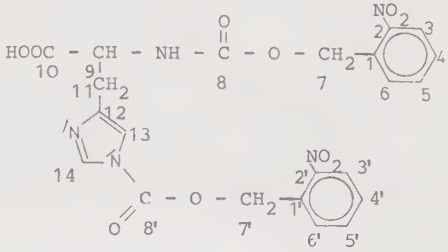
^{1}H-NMR (DMSO-d_6):

δ-Werte (ppm)		Multiplizität/Intensität		Zuordnung
3.66	3.72	Dublett	2H	9
5.40		Singulett	2H	7
7.60-7.81		Multiplett	5H	3-6 und NH
8.07	8.16	Dublett		

^{13}C-NMR (DMSO-d_6):

δ-Werte (ppm)	Zuordnung	δ-Werte (ppm)	Zuordnung
42.2	9	132.7	1
62.3	7	134.1	5
124.7	3	147.1	2
128.8	6	156.1	8
129.9	4	171.5	10

N(α),N(Im)-Di-o-nitrobenzyloxycarbonyl-L-Histidin
(Di-NBOC-His):
Ausbeute: 19.5 g
(95 % d.Th.), weiße
Kristalle, die sich
vor Erreichen ihres
Schmelzpunktes zer-
setzen



EA $C_{22}H_{19}N_5O_{10}$ (513.5)

ber. (%): C 51.47 H 3.13 N 13.64

gef. (%): C 51.78 H 4.18 N 13.38

^{1}H-NMR (DMSO-d_6):

δ-Werte (ppm)		Multiplizität/Intensität		Zuordnung
2.89	2.98	verbreitert	2H	11
4.28	4.34	verbreitert	1H	9
5.36		Singulett	2H	7
5.77		Singulett	2H	7'
7.42 - 8.04		Multiplett	11H	3-6, 3'-6',
8.06 - 8.30		Multiplett		13, 14 und NH

^{13}C-NMR (DMSO-d_6):

δ-Werte (ppm)		Zuordnung	δ-Werte (ppm)		Zuordnung
28.6		11	130.1	130.6	4, 4'
54.1		9	132.9	133.4	1, 1'
62.1	66.0	7, 7'	134.2	134.2	5, 5'
116.7		12	139.7		13
124.9	124.9	3, 3'	147.0	147.8	2, 2'
128.5	128.8	6, 6'	153.8	155.6	8, 8'
129.7		14	173.1		10

4.1.5. Kupplung der N-geschützten Aminosäuren an das funktionalisierte Dextran

Das geschützte Aminosäurederivat (4.4 mMol) wird in 10 ml DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. Die entsprechende Menge DCCI (1 ml einer 2 molaren Lösung in CH_2Cl_2) wird zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren bei 0°C wird noch 40 Minuten bei RT gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird mit einer Glasfritte abfiltriert. 3.49 g Aminodextran (entsprechend 1 mMol primärer Aminogruppen) werden in 40 ml abs. DMSO gelöst und mit 0.5 ml NMM versetzt. Die filtrierte

Aminosäureanhydridlösung wird langsam zur Polymerlösung zugetropft. Die Reaktionslösung wird zunächst 10 Stunden bei RT, dann weitere 30 Stunden bei 35°C unter Lichtausschluß vorsichtig gerührt. Die Reaktion wird beeendet, indem die Lösung unter Rühren in 2 l Ethanol gegossen wird. Das Produkt fällt aus, wird abfiltriert, 10 x mit Ethanol und 1 x mit Ether gewaschen, im Vakuum getrocknet und 1 x in 40 ml DMSO gelöst und in 2 l Ethanol umgefällt. Die Ausbeute beträgt 3.8 g (88 % d.Th. bezogen auf ein Polymermolekül mit 11 gekuppelten Glycin-Derivaten).

Die Belegung der Spacer des Aminodextrans mit NBOC-Aminosäuren kann mit 2 Methoden bestimmt werden. Aus der Elementaranalyse kann über die Zunahme der Stickstoffwerte die Belegung errechnet werden. Präzisere Bestimmungen sind mit der Aminosäurenanalyse möglich. Die Dextran-Aminosäure-Derivate werden in einem Reakti Vial oder in einer zugeschmolzenen Ampulle mit 6 n HCl bei 110°C in 24 Stunden hydrolysiert. Die Lösung wird unter Stickstoff bis zur Trockene eingeengt, der Rückstand in Natriumcitrat-Puffer pH 2.2 gelöst und ein Teil dieser Lösung im Aminosäureanalysator bestimmt.
Mit optimierten Reaktionsbedingungen können folgende maximale Belegungen am Polymer erzielt werden (bezogen auf die primären Dextran-Aminogruppen):

Dextran-NH-Gly-NBOC: EA: 84 %
ASA: 85 % bzw. 11 belegte Spacer pro Dextranmolekül

Dextran-NH-His-di-NBOC: EA: 80 %
ASA: 78 % bzw. 10.1 belegte Spacer pro Dextranmolekül

Die Werte werden durch DNP-Derivatisierung der nicht besetzten Aminogruppen bestätigt.

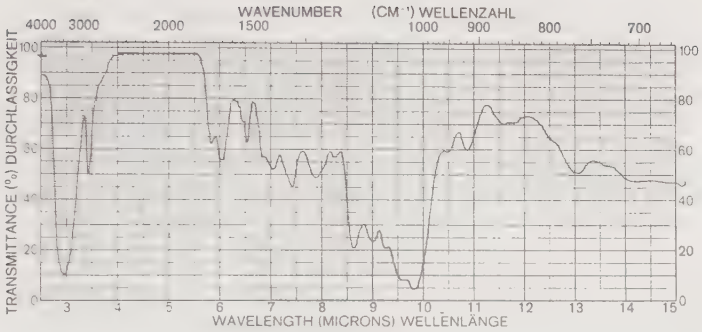


Abb. 53: IR-Spektrum von Dextran-NH-Gly-NBOC

4.1.6. Photolytische Abspaltung der NBOC-Schutzgruppe

Zur Photolyse werden Lösungen der geschützten Dextran-Aminosäure-Derivate in DMSO bzw. DMSO/H_2O-Gemischen mit 10, 17, 20 und 50 Vol% Wassergehalt hergestellt und mit je 0.5 ml NMM versetzt. Die Konzentrationen entsprechen $2.3 \cdot 10^{-2}$ molaren Lösungen der NBOC-Aminosäuren. Zur Bestrahlung wird eine 150 Watt Quecksilber Tauchlampe mit doppelwandigem Quarzkühler verwendet. Zwischen Tauchlampe und Probe wird die harte Strahlung mit kürzeren Wellenlängen als 300 nm durch Duranglas herausgefiltert. Den Lösungen werden nach 5,10,20,30,60,90,120 und 180 Minuten Proben entnommen, die in der zehnfachen Menge Ethanol gefällt und abzentrifugiert werden. Die Proben werden gereinigt durch Waschen mit Ethanol (2 x) und Ether (1 x), getrocknet, in DMSO gelöst und wiederum mit Ethanol gefällt und gewaschen.
Aus den Versuchsreihen ergibt sich eine optimale Bestrahlungsdauer von 10 Minuten in reinem DMSO. In den Produkten können die gekuppelten Aminosäuren durch ASA in

folgenden Prozentsätzen wiedergefunden werden (bezogen auf die geschützten Derivate):

Dextran-NH-Gly: 100 % Glycin bzw. 11 Glycinreste pro Dextranmolekül

Dextran-NH-His: 87 % Histidin bzw. 8.8 Histidinreste pro Dextranmolekül

Die Verbindung Dextran-NH-Gly-His wird durch erneute Kupplung von Di-NBOC-His an Dextran-NH-Gly und Photolyse der Schutzgruppen erhalten. Sie enthält nur noch 3.5 Histidinreste pro Dextranmolekül oder 27 % bezogen auf die Aminogruppen des Aminodextrans.

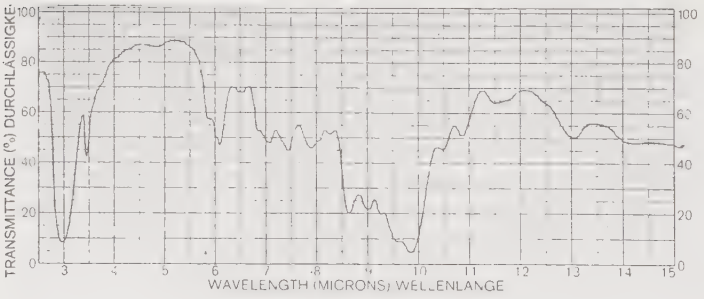


Abb. 54: IR-Spektrum der Verbindung Dextran-NH-Gly nach 10 Minuten Bestrahlung in DMSO

4.2. Benzyloxycarbonyl-Glycin-Histidin-Methylester

4.2.1. Ausgangsprodukte

Benzyloxycarbonylglycin

Z-Gly wird nach der Methode von Bergmann u. Zervas[136] hergestellt. Überschüssiger Chlorameisensäurebenzylester wird mit Ether extrahiert. Die wässrige Reaktionslösung wird mit pelletierter Aktivkohle gerührt[137].

L-Histidinmethylester

His-OMe x 2 HCl wird nach der Vorschrift aus Houben-Weyl hergestellt[138]. His-OMe wird aus dem Dihydrochlorid mit ammoniakgesättigtem $CHCl_3$ erhalten[89].

N-Hydroxysuccinimid

H-OSU kann aus Bernsteinsäureanhydrid und Hydroxylamin-Hydrochlorid hergestellt werden[88].

TDM-Reagenz

4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan wurde als Anfärbereagenz für die Dünnschichtchromatographie verwendet[139].

4.2.2. Benzyloxycarbonylglycin-N-hydroxysuccinimidester (Z-Gly-OSU)

20.9 g Z-Gly (0.1 Mol) und 11.5 g H-OSU (0.1 Mol) werden in 200 ml absolutem Dioxan gelöst. Die Lösung wird auf 15°C abgekühlt und unter Rühren werden 20.6 g DCCI (0.1 Mol) in 50 ml Dioxan zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 3 Stunden bei 15°C, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Man erhält ein gelbes Öl, das in CH_2Cl_2 aufgenommen wird. Diese Lösung wird in stark gekühlten Petrolether 30/50 eingetropft, das Produkt fällt weiß aus, wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.
Ausbeute: 26.8 g (87 % d.Th.); F. 112°C

EA $C_{14}H_{14}N_2O_6$ (306.3)

ber. (%): C 54.90 H 4.62 N 9.15
gef. (%): C 54.96 H 4.52 N 9.34

FD-MS: $M^{\oplus}$ m/z 306

^{1}H-NMR: vgl. Abb. 21 und Tab. 1

^{13}C-NMR: vgl. Abb. 22 und Tab. 2

4.2.3. Benzyloxycarbonyl-Glycin-Histidin-Methylester (Z-Gly-His-OMe)

8.7 g His-OMe x 2 HCl (36 mMol) werden mit 50 ml ammoniakgesättigtem $CHCl_3$ bei 0°C versetzt. Nach 1 Stunde rühren ist der freigesetzte Histidinmethylester in Lösung gegangen, das ausgefallene NH_4Cl wird abfiltriert. 30 ml $CHCl_3$ werden abdestilliert, dann 120 ml absolutes Dioxan zugegeben. Zu dieser Lösung werden 4.6 g Z-Gly-OSU (15 mMol) in 30 ml absolutem Dioxan zugetropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Es bleibt eine zähe, gelbliche Substanz zurück. Das Rohprodukt wird mit verdünnter K_2CO_3-Lösung (pH 9) versetzt und mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wird mit Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels liegt die Substanz als zähe, amorphe Masse vor. Sie kann durch Zugabe von gekühltem, absolutem Diethylether zur Kristallisation gezwungen werden. Diethylether wird am Rotationsverdampfer ohne Heizbad abgezogen. Das weiße, kristalline Z-Gly-His-OMe muß in der

Kälte aufbewahrt werden.

Ausbeute: 5.0 g (92 % d.Th. bezogen auf Z-Gly-OSU)

R_f = 0.52, Chlor-TDM-Test, Laufmittelgemisch Benzol/$CHCl_3$/ MeOH/H_2O im Verhältnis 8/8/8/1

EA $C_{17}H_{20}N_4O_5$ (360.4)

ber. (%): C 56.66 H 5.59 N 15.55

gef. (%): C 56.74 H 5.40 N 15.67

FD-MS: $(M+1)^{\oplus}$ m/z 361

^{1}H-NMR: vgl. Abb. 21 und Tab. 1

^{13}C-NMR: vgl. Abb. 22 und Tab. 2

Zur Zuordnung werden die ^{13}C-NMR-Signale von Histidin in D_2O, pH 6.3 herangezogen[140].

Glycin-Histidin-Methylester

360 mg Z-Gly-His-OMe (1 mMol) werden in 140 ml absolutem Methanol gelöst und in Gegenwart von 40 mg 10 % Pd/Aktivkohle hydriert. Nach etwa 40 Minuten ist der Spot des Z-Gly-His-OMe im Dünnschichtchromatogramm verschwunden. Die Schutzgruppe ist quantitativ abgespalten, der Katalysator wird abfiltriert. Nach Zugabe von 30 ml DMF wird das Methanol am Rotationsverdampfer möglichst vollständig abgezogen. H-Gly-His-OMe wird in DMF gelöst weiterverarbeitet.

DC: H-Gly-His-OMe: R_f = 0.05,
Dioxopiperazinderivat: R_f = 0.31, Chlor-TDM-Test,
Benzol/$CHCl_3$/MeOH/H_2O im Verhältnis 8/8/8/1

4.3. Kupplung der Dextran-Hämopolymere

Aktivierung des Hämins

652 mg Hämin (1 mMol) werden in 200 ml DMF gelöst. Unter Rühren werden 0.23 ml N-Methylmorpholin (2.1 mMol) und 0.2 ml frisch destillierter Chlorameisensäureethylester (2.1 mMol) zugetropft und 30 Minuten bei +4°C gerührt.

DC: monoaktiviertes Hämin: R_f = 0.67,
diaktiviertes Hämin: R_f = 0.95, $CHCl_3$/MeOH 2/1

Kupplungsreaktion

Die Menge der jeweiligen Polymerkomponente, die 0.2 mMol an freien, primären Aminogruppen enthält, wird in 300 ml DMSO gelöst und mit 2 ml NMM versetzt. In diese Lösung wird zunächst die aktivierte Hämin-Lösung eingetropft, anschließend 1 mMol H-Gly-His-OMe in 30 ml DMF. Der fünffache Überschuß an Porphyrin- und Dipeptid-Komponente gewährleistet die vollständige Belegung der Spacergruppen des Polymers. Die Reaktionslösungen werden 70 Stunden sehr vorsichtig unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gerührt. Die Hämopolymere werden isoliert durch Eintropfen der Lösungen in Methylethylketon. Die Reinigung erfolgt durch Umfällen aus DMSO/Methylethylketon bzw. DMSO/Diethylether. Man erhält die Dextran-Hämopolymere in Ausbeuten zwischen 87 und 95 % bezogen auf die Polymerkomponenten. Die Belegung der Polymere mit Porphyrinzentren kann aus den Extinktionswerten der UV-VIS-Spektren bestimmt werden. Die Werte stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen mit denen überein, die für die Aminosäurebelegung der Spacer nach der Schutzgruppenabspaltung ermittelt wurden.

4.4. Oxygenierungsuntersuchungen

Die Oxygenierungsuntersuchungen werden in einer Schutzgasküvette durchgeführt, die mit einem seitlich angebrachten Reaktionsraum versehen ist. Die Küvette wird mit einem doppelten Gummiseptum[141] verschlossen. Sie kann über einen Sekurieransatz evakuiert werden. Die Spezial-Quarzküvetten sind in 1 cm, 0.5 cm und 1 mm Schichtdicke verfügbar.

Zur Reduktion in organischen Lösungsmitteln wird im seitlichen Reaktionsraum vor der Oxygenierungsuntersuchung ein Dithionitkronenether-Komplex hergestellt. 7 mg Natriumdithionit (0.04 mMol) und 26 mg 18-Krone-6 (0.1 mMol) werden mit 4 ml absolutem, N_2-gesättigtem Methanol gerührt. Wenn sich das Dithionit völlig gelöst hat, wird durch vorsichtiges Evakuieren das Methanol vollständig abgezogen. Die Reihenfolge, in der die UV-VIS-Spektren im Verlauf einer Oxygenierungsuntersuchung aufgenommen werden, ist im Allgemeinen Teil beschrieben.

Geräteparameter:

Beckman Acta M VII:	Scan-Speed	2 nm/sec
	Chart	50 nm/inch
	Period	2
Perkin Elmer Lambda 5:	Scan-Speed	240 nm/min
	Slit	2 nm
	Response	0.5 sec
	Abscissa Format	20 nm/cm

5. Proteingebundene Porphyrinderivate

5.1. Darstellung von Hämin(mono)-Gly-His-OMe

Hämin und Chlorameisensäureethylester werden nach dem in Abschnitt 4.3. beschriebenen Verfahren im Molverhältnis 1:1.05 umgesetzt. Zum aktivierten Hämin wird eine äquimolare Lösung von H-Gly-His-OMe in DMF getropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei +4°C gerührt. Durch Eintropfen der Lösung in Diethylether werden die Produkte isoliert. Die Trennung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit $CHCl_3$/MeOH 2/1:

a) diaktiviertes Hämin; R_f = 0.95
b) Hämin(methylester)(-Gly-His-OMe); R_f = 0.89
c) Hämin-(bis)-Gly-His-OMe; R_f = 0.75
d) Hämin-(mono)-Gly-His-OMe; R_f = 0.42

alle R_f-Werte für $CHCl_3$/MeOH 2/1

5.2. Albumin- und Gelatinegebundenes Hämin-(mono)-Gly-His-OMe

Die folgenden Lösungen wurden verwendet und in verschiedenen Volumenverhältnissen umgesetzt:

Humanserumalbumin: 20 % wässrige Lösung
modifizierte Gelatine: 3.5 % wässrige Lösung
wässrige, micellare Porphyrinlösungen: 0.3 $\frac{\mu Mol}{ml}$ Hämin(mono)-Gly-His-OMe mit einer Detergenskonzentration von 10 $\frac{\mu Mol}{ml}$
bzw.
0.03 $\frac{\mu Mol}{ml}$ Hämin(mono)-Gly-His-OMe mit einer Detergenskonzentration von 2.75 $\frac{\mu Mol}{ml}$

Als Ultrafiltrationsmembranen mit der Ausschlußgrenze 10 000 wurden verwendet:

- für die Abtrennung der Stabilisatoren aus Humanserumalbumin: Polysulfon
- für die Abtrennung des Detergens aus der Albumin-Porphyrin-Lösung: Polyacryl
- für die Abtrennung des Detergens aus der Gelatine-Porphyrin-Lösung: Polysulfon

Die Ultrafiltrationen wurden unter einem Stickstoffdruck von 2 bar durchgeführt.

Maximal erreichte Beladungen (im molaren Verhältnis):

Humanserumalbumin / Häminderivat	1/2
modifizierte Gelatine / Häminderivat	2/1

5.3. Hämin(mono)-methylimidazolpentylamid

5.3.1. 1-Phthalimido-5-brom-pentan

74 g Kaliumphthalimid (0.4 Mol) werden in 300 g 1,5-Dibrompentan (1.3 Mol) suspendiert und unter Rückfluß erhitzt. Die Siedetemperatur der Reaktionsmischung steigt kontinuierlich an und hat nach 18 Stunden 180°C erreicht. Nicht umgesetztes Dibrompentan wird durch Wasserdampfdestillation entfernt. Aus dem Rückstand wird das Rohprodukt mit $CHCl_3$ extrahiert. Nach dem Abziehen des $CHCl_3$ verbleibt ein braunes Rohprodukt, aus dem das 1-Phthalimido-5-brompentan mit Petrolether 30/50 selektiv herausgelöst werden kann. Die Nebenprodukte werden abfiltriert. Aus dem Filtrat erhält man reine, weiße Kristalle.
Ausbeute: 25 g (65 % d.Th.)
R_f = 0.45 im Fließmittelsystem (Petrolether 30/50/$CHCl_3$/ Aceton) (15/5/2)

EA $C_{13}H_{14}BrNO_2$ (296.2)

ber. (%): C 52.72 H 4.76 Br 26.98 N 4.73

gef. (%): C 53.77 H 5.28 Br 25.48 N 4.74

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) (Abb. 55)

δ-Werte (ppm)	Multiplizität/Intensität		Zuordnung
1.35 - 2.05	Multiplett	6H	$-(CH_2)_3-$
3.38	Triplett	2H	$-CH_2-Br$
3.68	Triplett	2H	$-CH_2$-Phthalimid
7.63 - 7.88	Multiplett	4H	Phthalimid-protonen

^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (Abb. 57), Zuordnung in Tab. 4 und 5

5.3.2. 1-Phthalimido-5-N-(2-methylimidazol)-pentan

1.64 g 2-Methylimidazol (0.02 Mol) werden in 100 ml absolutem Toluol unter Argon mit 0.9 g NaH 99 % (0.037 Mol) 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt. In die abgekühlte Reaktionsmischung werden 5.92 g 1-Phthalimido-5-brom-pentan (0.02 Mol) eingetragen. Die Reaktionslösung wird weitere 14 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abfiltrieren der festen Rückstände und dem Abziehen des Toluols am Rotationsverdampfer erhält man das kristalline Produkt. Es wird durch Umkristallisieren aus Toluol gereinigt.

Ausbeute: 2.3 g (55 % d.Th.)

R_f = 0.20, $CHCl_3$/MeOH 20/1

EA: $C_{17}H_{19}N_3O_2$ (297.4)

ber. (%): C 68.67 H 6.44 N 14.13

gef. (%): C 69.29 H 7.40 N 14.76

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) (Abb. 55)

δ-Werte (ppm)	Multiplizität/Intensität		Zuordnung
1.20 - 1.78	Multiplett	6H	$-(CH_2)_3-$
2.25	Singulett	3H	$-CH_3$
3.58	Triplett	2H	$-CH_2$-Imidazol
3.72	Triplett	2H	$-CH_2$-Phthalimid
6.69 6.70	Dublett	1H	Imidazol-
6.75 6.76	Dublett	1H	Protonen

^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (Abb. 57), Zuordnung in Tab. 4 und 5

5.3.3. 1-Amino-5-N-(2-methylimidazol)-pentan

Die Hydrazinolyse der Phthalimid-Gruppe wird in Methanol mit der äquimolaren Menge Hydrazinhydrat in der Siedehitze durchgeführt. Nach Zugabe von H_2O und konz. HCl fällt das Produkt als Dihydrochlorid aus, das durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt werden kann.
Ausbeute: 82 % d.Th.

EA: $C_9H_{19}Cl_2N_3$ (240.2)

ber. (%): C 45.01 H 7.97 Cl 29.52 N 17.50
gef. (%): C 41.44 H 8.32 Cl 32.65 N 18.14

FD-MS: $M^{\oplus}$ m/z 167

Die Freisetzung des Methylimidazolpentylamins erfolgt mit der äquimolaren Menge Natrium-Methylat in absolutem Methanol.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) (Abb. 56)

Dihydrochlorid	freigesetztes Produkt	Zuordnung
1.11 - 1.89	1.13 - 1.77	$-(CH_2)_3-$
2.49	2.24	$-CH_3$
4.06	3.81	$-CH_2$-Imidazol
6.35	3.15	$-CH_2-NH_x$
7.53 7.56	6.67 6.69	Imidazol-
7.67 7.70	6.99 7.01	Protonen
8.24		

^{13}C-NMR (D_2O) des Dihydrochlorids, vgl. Abb. 57, Zuordnung in Tab. 4 und 5.

5.3.4. Hämin(mono)-methylimidazolpentylamid

Hämin wird nach der beschriebenen Methode (vgl. Abschnitt 4.3.) mit Chlorameisensäureethylester mono-aktiviert und mit 1-Amino-5-N-(2-methylimidazol)-pentan in DMF umgesetzt. Das Produktgemisch wird durch Eintropfen in Diethylether ausgefällt, isoliert und durch Säulenchromatographie an RP-18-Material getrennt. Als erste Fraktion erhält man wenig nicht umgesetztes Hämin (R_f = 0.92), als zweite Fraktion wird Hämin(mono)-methylimidazolpentylamid isoliert:
R_f = 0.54;
FD-MS: $(M+1)^{\oplus}$ (ohne Chloridion) m/z 766

Hämin(bis)-methylimidazolpentylamid:
R_f = 0.12, alle R_f-Werte für RP-18 DC-Platten,
Fließmittelsystem $CHCl_3$/MeOH 10/1
FD-MS $(M+1)^{\oplus}$ (ohne $Cl^{\ominus}$) m/z 915

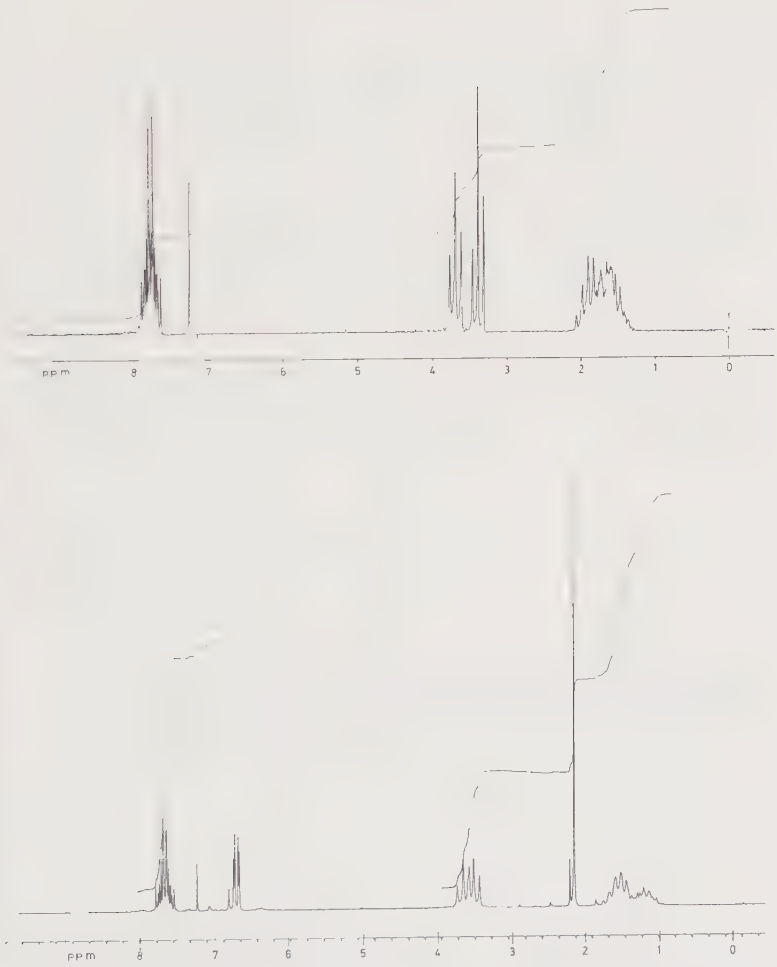


Abb. 55: ^{1}H-NMR-Spektren des 1-Phthalimido-5-brompentans (oben) und 1-Phthalimido-5-N-(2-methylimidazol)-pentans in $CDCl_3$

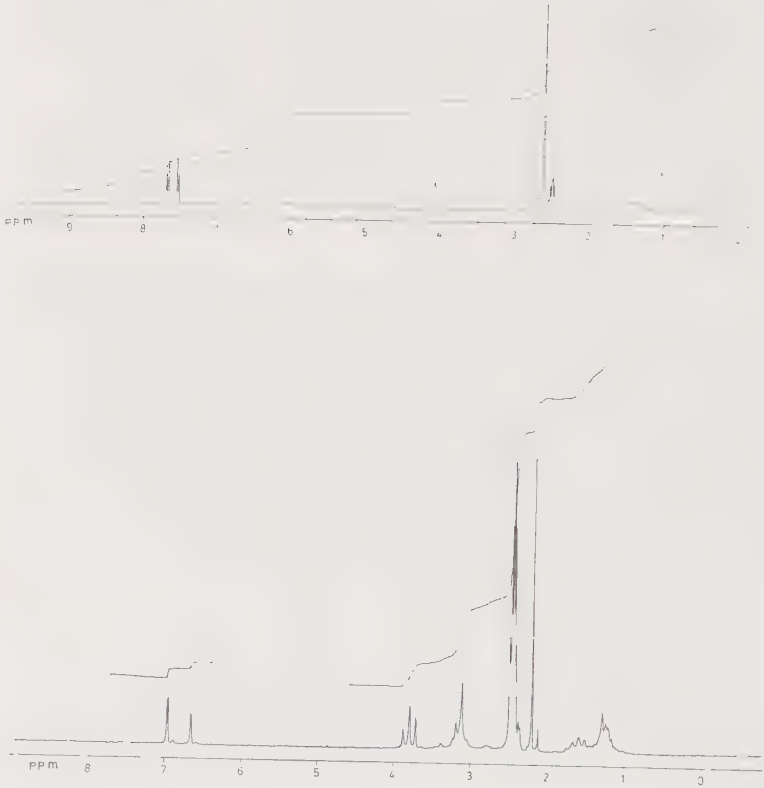


Abb. 56: ^{1}H-NMR-Spektren des Methylimidazolpentylamin-Dihydrochlorids (oben) und der freigesetzten Verbindung in DMSO-d_6

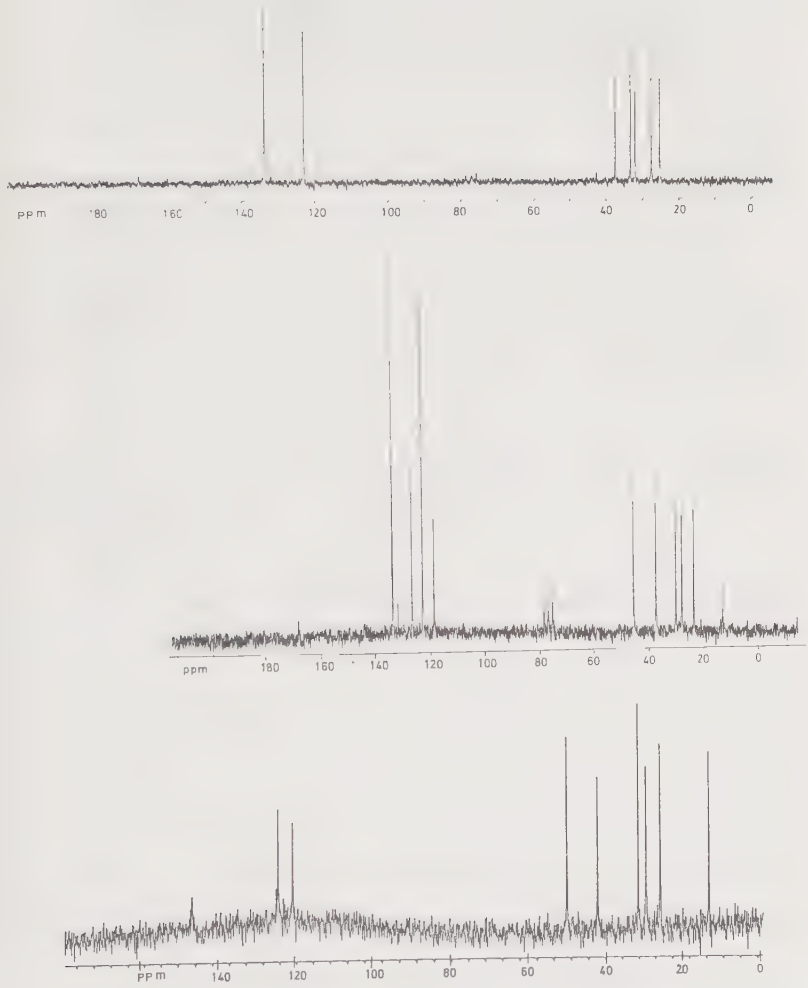


Abb. 57: ^{13}C-NMR-Spektren des 1-Phthalimido-5-brompentans ($CDCl_3$, oben), des 1-Phthalimido-5-N-(2-methylimidazol)-pentans ($CDCl_3$, Mitte) und des Methylimidazolpentylamin-Dihydrochlorids (D_2O)

Tab. 4: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Spektren im Bereich der Methylen-Kohlenstoffatome verglichen mit den δ-Werten aus Inkrementberechnungen[142)]

Phthalimid - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - Br					
ber. (ppm):	42.3	24.3	25.8	33.8	32.9
gef. (ppm):	37.37	25.13	27.44	33.16	31.93

Phthalimid - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - Methyl-imidazol					
ber. (ppm):	42.3	25.0	26.6	30.4	45.5
gef. (ppm):	37.39	23.69	27.89	30.05	45.68

$Cl^{\ominus}$ $H_3N^{\oplus}$ - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - Methyl-imidazol x HCl					
ber. (ppm):	44.7	19.1	24.5	29.0	45.5
gef. (ppm):	41.86	25.26	28.95	31.06	49.72

Tab. 5: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Spektren im Bereich der Phthalimid- und Imidazol-Kohlenstoffatome, zum Vergleich den Resonanzen des Phthaloyl-Histidin-methylesters gegenübergestellt[143)]

Phthaloyl-Histidinmethyl-ester-Hydro-chlorid	1-Phthalimido-5-N-(2-methyl-imidazol)-pentan	Methylimidazol-pentylamin-Dihydrochlorid
26.80		
53.35		
56.02		
119.80	118.78	120.34
126.22	123.04	
130.94	126.90	124.10
132.81	131.91	
136.05		
137.70	133.78	146.65
171.01		
172.20	168.11	
	199.83	

6. Liposomenverkapseltes Häminderivat

Die Liposomenpräparationen mit dem Detergens-Dialyse-Verfahren wurden von Herrn J. Haab nach folgendem Schema durchgeführt: das Lipid, das Häminderivat und das Detergens Natriumcholat werden in CH_2Cl_2/MeOH 2/1 gelöst. Nach dem Abziehen der Lösungsmittel verbleibt ein Lipidfilm, der in $10 \cdot 10^{-3}$ molarem MOPS-Puffer (pH 7.2) aufgenommen werden kann. Es haben sich gemischte Lipid-Detergens-Micellen gebildet. In einem Lipoprep-Gerät wird das Detergens Natriumcholat durch Dialyse gegen Puffer an einer Membran mit der Ausschlußgrenze 5 000 entfernt. Man erhält unilamellare Liposomen, die durch Gelchromatographie an Sephadex G 50M gereinigt werden können.
Bei einer Lipidkonzentration von 20 $\frac{\mu Mol}{ml}$ konnten maximal 0.58 $\frac{\mu Mol}{ml}$ Porphyrinderivat eingeschlossen werden.
Die Oxygenierungsuntersuchungen wurden nach dem vorgestellten Verfahren durchgeführt.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Bindung von Eisen-Protoporphyrin-Derivaten an hochmolekulare Träger werden Modellsubstanzen für Metallproteine erhalten, die für den Transport und die Steuerung der biologischen Aktivitäten von Sauerstoff und seiner reduzierten Spezies verantwortlich sind.

Die synthetisierten Dextran-Hämopolymere sind gut wasserlöslich. Die Solubilisierung der Porphyrinsysteme wird durch kovalente Bindung an das funktionalisierte Polysaccharid erreicht. Die Funktion des proximalen Histidins im natürlichen Vorbild Myoglobin wird von dem Dipeptid Glycin-Histidin-Methylester übernommen, das kovalent an eine Propionsäuregruppe des Hämins gebunden ist. Die Hämopolymere Dextran-NH-His-Häm-Gly-His-OMe und Dextran-NH-Gly-His-Häm-Gly-His-OMe sind reversibel oxygenierbar im aprotisch diploaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid. Die Imitation des distalen Histidins in diesen Systemen stabilisiert die Oxokomplexe soweit, daß sie in Dimethylsulfoxid bei Raumtemperatur beobachtet werden können. Bedingt durch Nebenreaktionen des Reduktionsmittels Dithionit mit Sauerstoff unterliegen die Komplexe jedoch einer langsamen Oxidationsreaktion; ihre Halbwertszeiten betragen 35 Minuten.

In wässriger Lösung bilden die Dextran-Hämopolymere keine bei Raumtemperatur stabilen Sauerstoffkomplexe. Die Aktivzentren werden durch die Einbettung im Polymerknäuel zwar vor der Dimerisierung geschützt, der dimere Oxidationsmechanismus wird dadurch ausgeschaltet. Das Polysaccharid bietet jedoch für das Aktivzentrum keine hydrophobe Abschirmung gegen die protonenkatalysierte Oxidation in Wasser.

Aus der elektronenspektroskopischen Untersuchung des Hämopolymers Dextran-NH-Gly-Häm-Gly-His-OMe in Dimethylsulfoxid kann auf eine ähnliche stereochemische Umgebung des Aktivzentrums im Cytochrom a_3 geschlossen werden.

Als hochmolekulare Trägerkomponenten für Porphyrinsysteme kommen auch Albumin- und Gelatinelösungen sowie Phospholipidvesikel in Frage. Zur koordinativen Fixierung an diesen wasserlöslichen Biopolymeren wird das pentakoordinierte Aktivzentrum Hämin(mono)-Gly-His-OMe synthetisiert. Die Konzeption der kovalenten Bindung des fünften Liganden am Porphyrinsystem wird beibehalten.

Für die Bindung des Hämin-Derivates an Proteine wird eine Detergens-Ultrafiltrations-Technik entwickelt. Das an Humanserumalbumin gebundene Häm(mono)-Gly-His-OMe ist in Dimethylsulfoxid reversibel oxygenierbar. Wie bei den Dextran-Hämopolymeren wird eine langsame Oxidationsreaktion beobachtet, die Halbwertszeit des Sauerstoffkomplexes beträgt 48 Minuten. Die Abschirmung des Häm-Aktivzentrums ist bei den albumin- und gelatinegebundenen Systemen soweit verbessert, daß die Sauerstoffkomplexe in wässriger Lösung beobachtet werden können. Die protonen-katalysierte Oxidation wird durch das Protein verlangsamt aber nicht völlig verhindert.

Durch die Verkapselung des Häm(mono)-Gly-His-OMe in der Lipidschicht von Phospholipidvesikeln könnte der hydrophobe Schutz des Aktivzentrums hergestellt werden. Zum schonenden Einbau des Porphyrinsystems in die Liposomen wird die Detergens-Dialyse-Methode verwendet. Die erhaltenen unilamellaren Vesikel sind sehr stabil. Die eingeschlossenen Aktivzentren unterliegen jedoch auch in diesem System der protonen-katalysierten Oxidation. Aus dieser Beobachtung kann abgeleitet werden, daß sich die Häm-Aktivzentren durch polare Wechselwirkungen an den hydrophilen Kopfgruppen der Lipidmembran anordnen.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1) E.C. Niederhoffer, J.H. Timmons u. A.E. Martell, Chem. Rev. 84, 137 (1984)
2) J.E. Baldwin u. P. Perlmutter, Top. Curr. Chem. 121, 181 (1984)
3) M.M. Briggs u. R.A. Capaldi, Biochem. 16, 73 (1977)
4) P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 12. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1984
5) M.F. Perutz, Ann. Rev. Biochem. 48, 327 (1979)
6) C.L. Nobbs, H.C. Watson u. J.C. Kendrew, Nature 209, 339 (1966)
7) T. Takano, J. Mol. Biol. 110, 569 (1977)
8) R.E. Dickerson u. I. Geis, Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology, The Bejamin/ Cummings Publishing Comp., Menlo Park, California 1983
9) S.E.V. Phillips u. B.P. Schoenborn, Nature 292, 81 (1981)
10) S.E.V. Phillips, Nature 273, 247 (1978)
11) S.E.V. Phillips, J. Mol. Biol. 142, 531 (1980)
12) T. Takano, J. Mol. Biol. 110, 537 (1977)
13) B. Shaanan, Nature 296, 683 (1982)
14) G. Fermi, J. Mol. Biol. 97, 237 (1975)
15) J. Monod, J. Wyman u. J.P. Changeux, J. Mol. Biol. 12, 88 (1965)
16) R.C. Ladner, E.J. Heidner u. M.F. Perutz, J. Mol. Biol. 114, 385 (1977)
17) A. Brzozowski, Z. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, M. Grabowski, R. Liddington, T. Skarzyński u. D. Vallely, Nature 307, 74 (1984)
18) E. Bayer u. P. Schretzmann, Structure and Bonding 2, 181 (1967)

19) E. Bayer, P. Krauß, A. Röder u. P. Schretzmann, in T.E. King, H.S. Mason u. M. Morrison, Oxidases and Related Systems, University Park Press, Baltimore 1973

20) J.M. Klotz u. D.M. Kurtz, Acc. Chem. Res. 17, 16 (1984)

21) R.E. Stenkamp, L.C. Sieker, L.H. Jensen u. J. Sanders-Loehr, Nature 291, 263 (1981)

22) L.C. Sieker, R.E. Stenkamp u. L.H. Jensen, in H.B. Dunford, D. Dolphin, K.N. Raymond u. L. Sieker, The Biological Chemistry of Iron, Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Ser C 89, 161, D. Reidel Publ., Dordrecht (1982)

23) W.H. Armstrong, A. Spool, G.C. Papaefthymiou, R.B. Frankel u. S.J. Lippard, J. Amer. Chem. Soc. 106, 3653 (1984)

24) A.K. Shiemke, T.M. Loehr u. J. Sanders-Loehr, J. Amer. Chem. Soc. 106, 4951 (1984)

25) J. Markl, H. Decker, B. Linzen, W.G. Schutter u. E.F.J. van Bruggen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 74 (1982)

26) M.S. Co, K.O. Hodgson, T.K. Eccles u. R. Lontie, J. Amer. Chem. Soc. 103, 984 (1981)

27) H.-J. Schneider, U. Illig, E. Müller, B. Linzen, F. Lottspeich u. A. Henschen, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 487 (1982)

28) B. Linzen, Forschung, Mitteilungen der DFG 1/1984, 10

29) R.D. Jones, D.A. Summerville u. F. Basolo, Chem. Rev. 79, 139 (1979)

30) J.P. Collman, Acc. Chem. Res. 10, 265 (1977)

31) J.W. Buchler, Angew. Chem. 90, 425 (1978)

32) H. Dugas u. C. Penny, Bioorganic Chemistry, Springer-Verlag New York, 1981

33) J.E. Baldwin u. J. Huff, J. Amer. Chem. Soc. 95, 5757 (1973)

34) N. Herron, J.H. Cameron, G.L. Neer u. D.H. Busch, J. Amer. Chem. Soc. 105, 298 (1983)

35) N. Herron, M.Y. Chavan u. D.H. Busch, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1984, 1491

36) J.P. Collman, R.R. Gagne, T.R. Halbert, J.-C. Marchon u. C.A. Reed, J. Amer. Chem. Soc. 95, 7868 (1973)

37) J.P. Collman, J.I. Brauman, K.M. Doxsee, T.R. Halbert, E. Bunnenberg, R.E. Linder, G.N. La Mar, J. Del Gaudio, G. Lang u. K. Spartalian, J. Amer. Chem. Soc. 102, 4182 (1980)

38) J.P. Collman, J.I. Brauman, T.J. Collins, B.L. Iverson, G. Lang, R.B. Pettman, J.L. Sessler u. M.A. Walters, J. Amer. Chem. Soc. 105, 3038 (1983)

39) C.K. Chang, J. Amer. Chem. Soc. 99, 2819 (1977)

40) J.E. Baldwin, M.J. Crossley, T. Klose, E.A. O'Rear u. M.K. Peters, Tetrahedron 38, 27 (1982)

41) A.R. Battersby u. A.D. Hamilton, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1980, 117

42) M. Momenteau, J. Mispelter, B. Loock u. J.-M. Lhoste, J. Chem. Soc. Perkin Trans.I, 1985, 61 und 221

43) J. Almog, J.E. Baldwin, R.I. Dyer u. M.K. Peters, J. Amer. Chem. Soc. 97, 226 (1975)

44) J.E. Baldwin, J.H. Cameron, M.J. Crossley, I.J. Dagley, S.R. Hall u. T. Klose, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1984, 1739

45) C.K. Chang u. T.G. Traylor, J. Amer. Chem. Soc. 95, 5810 (1973)

46) C.K. Chang u. T.G. Traylor, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2647 (1973)

47) T.G. Traylor, S. Tsuchiya, D. Campbell, M. Mitchell, D. Stynes u. N. Koga, J. Amer. Chem. Soc. 107, 604 (1985)

48) J.H. Wang, J. Amer. Chem. Soc. 80, 3168 (1958)

49) O. Leal, D.L. Anderson, R.G. Bowman, F. Basolo u. R.L. Burwell, J. Amer. Chem. Soc. 97, 5125 (1975)

50) K. Shigehara, K. Shinohara, Y. Sato u. E. Tsuchida, Macromolecules 14, 1153 (1981)

51) N. Nishide, M. Sekine u. E. Tsuchida, Polymer J. 14, 629 (1982)
52) E. Tsuchida, H. Hasegawa u. T. Kanayama, Macromolecules 11, 947 (1978)
53) G. Holzbach, Dissertation Universität Tübingen 1977
54) E. Tsuchida, H. Nishide u. Y. Sato, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1982, 556
55) E. Bayer u. G. Holzbach, Angew. Chem. 89, 120 (1977)
56) C. Homann, Dissertation Universität Tübingen 1979
57) M. Schleinzer, Diplomarbeit Universität Tübingen 1978
58) K. Shinohara, Dissertation Universität Tübingen 1984
59) M. Schleinzer, Dissertation Universität Tübingen 1982
60) H.-P. Seelmann-Eggebert, Dissertation Universität Tübingen 1983
61) L. Pauling, Nature 203, 182 (1964)
62) C.A. Reed u. S.K. Cheung, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1780 (1977)
63) D.H. Chin, G.N. La Mar u. A.L. Balch, J. Amer. Chem. Soc. 102, 4344 (1980)
64) D.H. Chin, J. Del Gaudio, G.N. La Mar u. A.L. Balch, J. Amer. Chem. Soc. 99, 5486 (1977)
65) L. Latos-Grazynski, R.-J. Cheng, G.N. La Mar u. A.L. Balch, J. Amer. Chem. Soc. 104, 5992 (1982)
66) G.N. La Mar, J.S. de Ropp, L. Latos-Grazynski, A.L. Balch, R.B. Johnson, K.M. Smith, D.W. Parish u. R.-J. Cheng, J. Amer. Chem. Soc. 105, 782 (1983)
67) A.B. Hoffman, D.M. Collins, V.W. Day, E.B. Fleischer, T.S. Srivastava u. J.L. Hoard, J. Amer. Chem. Soc. 94, 3620 (1972)
68) A.L. Balch, G.N. La Mar, L. Latos-Grazynski, M.W. Renner u. V. Thanabal, J. Amer. Chem. Soc. 107, 3003 (1985)
69) A.L. Balch, Y.-W. Chan, R.-J. Chang, G.N. La Mar, L. Latos-Grazynski u. M.W. Renner, J. Amer. Chem. Soc. 106, 7779 (1984)

70) M.M.L. Chu, C.E. Castro u. G.M. Hathanway, Biochemistry 17, 481 (1978)
71) W. Appel u. E. Biekert, Angew. Chem. 80, 719 (1968)
72) P.A. Sandford, Adv. Carbohydr. Chem. 36, 265 (1979)
73) B. Görlich, Mitt. Dtsch. Pharm. Ges. 39, 149 (1969)
74) S.-C. Tam, J. Blumenstein u. J.T.-F. Wong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2128 (1976)
75) P.G. Pietta, M. Pace, G. Palazzini u. A. Agostoni, Prep. Biochem. 14, 313 (1984)
76) W.M. Doane, B.S. Shasha, E.J. Stout, C.R. Russell u. C.E. Rist, Carbohydr. Res. 8, 266 (1968)
77) G.N. Kol'tsova, N.K. Krylova, A.E. Vasil'ev, A.M. Ovsepyan, V.M. Shlimak u. G.Ya. Rozenberg, J. Gen. Chem. USSR 47,, 1080 (1977)
78) O.M. Glozman, L.A. Zhmurenko, V.V. Shavyrina, D.O. Sterligov, N.M. Tsybina u. A.E. Vasil'ev, J. Gen. Chem. USSR 50, 1339 (1980)
79) E. Hasegawa, persönliche Mitteilung
80) A.A. Khachataryan u. L.A. Balikova, Bibl. haemat. 38, 773 (1971)
81) E. Hasegawa, unveröffentlichte Ergebnisse
82) A. Patchornik, B. Amit u. R.B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6333 (1970)
83) M. Keck, Diplomarbeit Universität Tübingen 1981
84) R. Eberle, Dissertation Universität Tübingen 1979
85) M. Mutter, R. Uhmann u. E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 1975, 901
86) J.A. Barltrop, P.L. Plant u. P. Schofield, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1966, 822
87) T.P. Molchanova, A.S. Molokoedov, E.I. Filippovich u. R.P. Evstigneeva, J. Gen. Chem. USSR 42, 1629 (1972)
88) G.W. Anderson, J.E. Zimmermann u. F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839 (1964)
89) G. Hillmann, Z. Naturforsch. 1, 682 (1946)

90) H. Eckstein u. E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 1978, 1607

91) E. Wünsch, Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band 15 (1), 52, G. Thieme Verlag Stuttgart 1974

92) G. Losse u. G. Müller, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 327, 205 (1962)

93) V.A. Radyukhin, E.I. Filippovich u. R.P. Evstigneeva, J. Gen. Chem. USSR 50, 552 (1980)

94) A.E. Vasil'ev, A.A. Khachatur'yan, B.N. Borisov, M.M. Ushakova u. G.Y. Rozenberg, J. Org. Chem. USSR 8, 2019 (1972)

95) V.A. Radyukhin, N.A. Kazakova, E.I. Filippovich u. R.P. Evstigneeva, J. Gen. Chem. USSR 52, 377 (1982)

96) A. van der Heijden, H.G. Peer u. A.H.A. van den Oord, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1971, 369

97) R. Eberle, unveröffentlichte Ergebnisse

98) T. Mincey u. T.G. Traylor, Bioinorg. Chem. 9, 409 (1978)

99) M.R. Lemberg, Physiol. Rev. 49, 48 (1969)

100) B. Kadenbach, Angew. Chem. 95, 273 (1983)

101) D.B. Winter, W.J. Bruyninckx, F.G. Foulke, N.P. Grinich u. H.S. Mason, J. Biol. Chem. 255, 11408 (1980)

102) W.H. Vanneste, Biochemistry 5, 838 (1966)

103) D.C. Wharton in G.L. Eichhorn, Inorganic Biochemistry, Vol. 2, Elsevier Scientific Publ. Comp., Amsterdam 1973

104) T.E. King, F.C. Yong u. S. Takemori, J. Biol. Chem. 242, 819 (1967)

105) E. Reddi, F. Ricchelli u. G. Jori, Int. J. Protein Res. 18, 402 (1981)

106) G.H. Beaven, S.-H. Chen, A. D'Albis u. W.B. Gratzer, Eur. J. Biochem. 41, 539 (1974)

107) U. Muller-Eberhard u. W.T. Morgan, Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 624 (1975)

108) G.R. Parr u. R.F. Pasternack, Bioinorg. Chem. 7, 277 (1977)

109) K. Düring, Diplomarbeit Universität Tübingen 1984

110) M.M. Shemyakin, Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiryushkin, E.J. Vinogradova, Y.B. Alakhov, V.M. Lipkin u. B.V. Rozynov, J. Gen. Chem. USSR 38, 765 (1968)

111) F.G. v.d. Haar, Dissertation Technische Hochschule Braunschweig 1966

112) H. Budzikiewicz, Z. Anal. Chem. 244, 1 (1969)

113) D.W. Thomas u. K. Biemann, J. Amer. Chem. Soc. 87, 5447 (1965)

114) G.W.A. Milne, A.A. Kiryushkin, Y.A. Alakhov, V.M. Lipkin u. Y.A. Ovchinnikov, Tetrahedron 26, 299 (1969)

115) G. Vossler, Dissertation Universität Tübingen 1982

116) T. Peters in F.W. Putnam, 'The Plasma Proteins', Second Edition, Vol. I, Academic Press New York 1975

117) H. Seiz u. F. Moll, "Gelatine", Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, Band 12, 211, Verlag Chemie Weinheim 1976

118) T. Mincey u. T.G. Traylor, J. Amer. Chem. Soc. 101, 765 (1979)

119) D.K. White, J.B. Cannon u. T.G. Traylor, J. Amer. Chem. Soc. 101, 2443 (1979)

120) T.G. Traylor, C.K. Chang, J. Geibel, A. Berzinis, T. Mincey u. J. Cannon, J. Amer. Chem. Soc. 101, 6716 (1979)

121) E. Tsuchida, H. Nishide, Y. Sato u. M. Kaneda, Bull. Chem. Soc. Jpn. 55, 1890 (1982)

122) G. Ramsey, Biochem. Prepn. 3, 39 (1953)

123) M.L. Mitchell, D.H. Campbell, T.G. Traylor u. T.G. Spiro, Inorg. Chem. 24, 967 (1985)

124) J.-H. Fuhrhop, 'Bioorganische Chemie', Thieme-Verlag Stuttgart 1982

125) J.-H. Fuhrhop u. D. Hosseinpour, Liebigs Ann. Chem. 1985, 689. Die Publikation ist Teil VII in der Reihe 'Porphyrins in Polymeric Matrices, Micelles and Vesicles', auf die vorherigen Teile wird jeweils verwiesen

126) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, E. Hasegawa, Y. Matsushita u. K. Eshima, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1985, 275

127) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa u. M. Sekine, Bull. Chem. Soc. Jpn. 57, 776 (1984) und dort zitierte Publikationen

128) I.P. Ushakova, I.A. Vasilenko, V.A. Radyukhin, A.S. Molokoedov, G.A. Serebrennikova, E.I. Filippovich u. R.P. Evstigneeva, Soviet J. Bioorg. Chem. 5, 1150 (1979)

129) J.-H. Fuhrhop u. J. Mathieu, Angew. Chem. 96, 124 (1984)

130) E. Bayer u. H.-P. Seelmann-Eggebert, Chromatographia 18, 65 (1984)

131) 'Organikum', 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1977

132) Firmenschrift 'Trocknen im Labor', Fa. E. Merck, Darmstadt

133) Nachr. Chem. Techn. 16, 260 (1968)

134) E.A. Kuznetsova, L.S. Shishkanova, G.E. Koroleva, E.D. Sinyagina, V.M. Shlimak und A.E. Vasil'ev, J. Gen. Chem. USSR 48, 1292 (1978)

135) K.R. Rao u. H.A. Sober, J. Amer. Chem. Soc. 76, 1328 (1954)

136) M. Bergmann u. L. Zervas, Chem. Ber. 65, 1192 (1932)

137) A.C. Farthing, J. Chem. Soc. 1950, 3213

138) E. Wünsch, Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band 15 (1), 538, G. Thieme Verlag Stuttgart 1974

139) E.v. Arx, M. Faupel u. M. Brugger, J. Chromatography 120, 224 (1976)

140) E. Breitmaier u. G. Jung, Organische Chemie II, S. 369, G. Thieme Verlag Stuttgart 1983

141) G. Gaßmann, Dissertation Universität Tübingen 1973

142) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl und W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer Verlag Berlin 1976

143) R.W. Cowgill, J. Amer. Chem. Soc. 79, 2249 (1957)

Meine akademischen Lehrer waren Frau Professor S. Kemmler-Sack sowie die Herren Professoren und Dozenten

E. Bayer, M. Baumann, W. Braun, E. Breitmaier, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, P. Krauß, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.-P. Lorenz, H. Mauser, H. Meier, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, H. Schott, V. Schurig, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub, H. Suhr, W. Voelter, W. Winter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Martin Wolfgang Keck

16.11.1952	geboren in Reutlingen als Sohn des Standesbeamten Hans Keck und seiner Ehefrau Else, geborene Koch
1959 - 1963	Grundschule in Reutlingen-Betzingen
1963 - 1971	Johannes-Kepler-Gymnasium Reutlingen
Juni 1971	Abitur
Oktober 1971	Immatrikulation im Fachbereich Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Oktober 1974	Vordiplom in Chemie
März 1980	mündliche Hauptdiplomprüfung in Chemie
April 1980 - Mai 1981	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer "Darstellung funktionalisierter Dextran-Derivate und deren Umsetzung mit N-terminal geschützten Aminosäuren"
Mai 1981	Diplom
Juni 1981 - September 1985	Experimenteller Teil der Dissertation "Synthese, Solubilisierung und Oxygenierung von Eisenporphyrinen" am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer
seit August 1981	Assistent im organischen Praktikum für Diplomchemiker
seit September 1985	verheiratet mit Maria Werner-Keck geb. Werner